



Ana Catarina Costa Araújo

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento de novos produtos
enriquecidos em hidroxitirosol para
aplicação na indústria alimentar /
farmacêutica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Ana Vital Morgado Marques Nunes,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Maria Franco Portugal da Costa Romeu,
Engenheira Química, Zeyton

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca

Arguente: Prof. Doutora Teresa Maria Alves Casimiro Ribeiro



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Ana Catarina Costa Araújo

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento de novos produtos
enriquecidos em hidroxitirosol para
aplicação na indústria alimentar /
farmacêutica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Ana Vital Morgado Marques Nunes,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Maria Franco Portugal da Costa Romeu,
Engenheira Química, Zeyton

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca

Arguente: Prof. Doutora Teresa Maria Alves Casimiro Ribeiro

Setembro 2017

Copyright

Desenvolvimento de novos produtos enriquecidos em hidroxitirosol para aplicação na indústria alimentar / farmacêutica

Copyright © 2017- Ana Catarina Costa Araújo e Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa

Todos os direitos reservados

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Com a realização desta dissertação de mestrado chega ao fim uma etapa imprescindível no meu percurso académico que não teria sido possível sem a ajuda e o apoio de todos aqueles aos quais estarei eternamente grata. Assim, ao longo destes seis meses, esta secção tornou-se pequena para exprimir a minha profunda gratidão e, desta forma quero apenas deixar algumas palavras a todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram a conseguir cada objectivo.

Ao professor Manuel Nunes da Ponte quero agradecer todos os conhecimentos que me foram transmitidos e a oportunidade de desenvolver um trabalho numa área pela qual me interesso particularmente.

Da mesma forma gostaria de agradecer o privilégio de ter tido como orientadora a Dr.^a Ana Vital Nunes que sempre se mostrou disponível e em muito contribuiu para o meu aprendizado.

À minha co-orientadora, Maria Romeu, um especial obrigado pelo apoio e por toda a ajuda ao longo deste trabalho.

À Sílvia Rebocho e à Catarina Melo quero agradecer toda a ajuda relativa ao manuseamento do *Morphology* e ao equipamento de secagem a azoto, respectivamente.

Relativamente aos colegas do Laboratório 427 gostaria de agradecer ao Dr. Alexandre Paiva e à Rita Craveiro por toda a ajuda e tempo disponibilizado na utilização do *Karl Fischer*. Ao Bruno Pedras um enorme obrigado pela paciência e disponibilidade prestada relativamente ao método do *Fenol Sulfúrico*.

Aos membros do iBET quero agradecer à Dr.^a Ana Matias pela disponibilidade na utilização do *Spray dryer* assim como à Ana Nunes por toda a ajuda no manuseamento do mesmo.

Aos técnicos de Laboratório de Análises da REQUIMTE, FCT-UNL, Carla Rodrigues e Nuno Costa um muito obrigada pela ajuda e esclarecimento de dúvidas nas análises de DSC e HPLC, respectivamente.

Um obrigado também ao Davide Mendes pela ajuda disponibilizada com as análises de GC.

Numa fase onde nem tudo correu como seria de esperar e com um nível de desgaste e cansaço acentuados, quero deixar bem claro o meu agradecimento relativamente aos meus colegas de laboratório que tornaram tudo muito mais fácil. Obrigado especialmente à Marta Marques por ter sido a minha compincha de laboratório.

Um obrigado também à Neide Gomes pela sua amizade ao longo destes 5 anos. Obrigada especialmente pela companhia e por todo o apoio principalmente nesta fase final.

Por último, mas não menos importante, um obrigado enorme à minha família sem a qual nada disto teria sido possível. Obrigada pela paciência, apoio e carinho.

A todos eles, **Muito Obrigada!**

Resumo

Neste trabalho foram estudadas várias formas de aplicação de um concentrado derivado do bagaço de azeitona para o desenvolvimento de novos produtos passíveis de serem comercializados. Assim, foram preparados concentrados evaporados que se revelaram estáveis em HT com uma concentração de 150 g/L para um período de 4 meses mesmo sob condições que desencadeiam a sua oxidação. Ainda neste estudo foi incluído um concentrado comercial, o *AquaOlive*, o qual também se apresentou estável.

Outra forma de aplicação estudada foi a incorporação do extrato em azeites. Desta forma foi dada continuidade ao estudo da conservação de azeites aditivados iniciado pela empresa *Zeyton* no qual se pretendia avaliar a estabilidade em HT+Ty pelo período de um ano, sendo que os azeites conservados a 5°C apresentaram os melhores resultados. Ainda no seguimento deste estudo, todos os azeites apresentaram uma concentração semelhante a um azeite da empresa *Derectil Nature*.

Nesta dissertação, foram ainda produzidos extractos sob a forma de pó seco para cápsulas de gelatina através da secagem do concentrado. Os pós obtidos directamente do extracto revelaram-se muito higroscópicos e pouco estáveis. Concluiu-se que somente se o concentrado for submetido a um processo de adsorção/dessorção se consegue um pó relativamente estável sendo que este tem de estar bem protegido da luz e ar atmosférico. Com 5 % em HT o pó revelou uma concentração superior ao da empresa *Derectil Nature*.

Palavras-Chave: Hidroxitirosol, alegação de saúde, extracto, azeites, cápsulas, pós.

Abstract

In this work different applications of a concentrated extract derived from olive pomace were studied for the development of new commercial products. Evaporated concentrates showed to be stable regarding their HT concentration of 150 g / L for approximately 4 months even under conditions that trigger oxidation. In this study was included a commercial concentrate, *AquaOlive*, which showed to be stable as well.

Another form of application studied was the incorporation of the aqueous concentrated in olive oils following a previous study started by the company *Zeyton*. The main objective was to analyze the stability in HT+Ty for 12 months. Thus, the olive oils stored at 5°C showed the best results. Furthermore, all the olive oils showed the same range of concentration of a commercial fortified olive oil from the company *Derectil Nature*.

In this dissertation dry powders were also prepared for the development of gelatin capsules. A spray drying process was applied to the aqueous extract. It was possible to conclude that powders obtained directly from the aqueous extract were too hygroscopic and unstable. Only concentrates submitted to an adsorption/desorption process gave rise to a relatively stable powder when protected from light and atmospheric air. With 5% in HT the powder revealed a higher concentration than a powder from the company *Derectil Nature*.

Keywords: Hydroxytyrosol, health claim, extract, olive oil, capsules, powders.

Conteúdo

Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XV
Abreviaturas e Símbolos	XVII
1. Introdução	1
1.1. Valorização do bagaço de azeitona	1
1.2. Origem e estrutura química do hidroxitirosol e do tirosol	2
1.3. Compostos fenólicos e a saúde humana	4
1.4. Processo de obtenção do extracto rico em hidroxitirosol	5
1.5. Aplicações do concentrado da osmose inversa	6
1.5.1. Preparação de azeites aditivados	6
1.5.2. Micropartículas do concentrado de osmose inversa para cápsulas de gelatina ..	7
2. Materiais e Métodos	11
2.1. Materiais	11
2.1.1. Concentrados do processo de osmose inversa	11
2.1.2. Dessorvidos do processo de adsorção	11
2.1.3. Azeites	12
2.1.4. Produtos concorrentes	12
2.1.5. Solventes, reagentes e padrões	12
2.2. Métodos	13
2.2.1. Quantificação de fenóis totais em concentrados de osmose inversa	13
2.2.2. Avaliação da quantidade de hidroxitirosol e tirosol presente em concentrados e dessorvidos	13
2.2.3. Quantificação de voláteis em concentrados de osmose inversa e em dessorvidos	13
2.2.4. Quantificação de hidratos de carbono no concentrado e no dessorvido	14
2.2.5. Estimativa rápida das concentrações de hidroxitirosol e tirosol nos concentrados de osmose inversa	15
2.2.6. Análise da estabilidade do concentrado de osmose inversa	15
2.2.7. Estudo da conservação do concentrado	15
2.2.8. Preparação de extractos aquosos com a adição de etanol em concentrados de osmose inversa	16
2.2.9. Preparação de extractos aquosos com a adição de glicerol em concentrados de osmose inversa	16
2.2.10. Estudo da conservação de azeites aditivados	16
2.2.11. Secagem por atomização de concentrados de osmose inversa e de dessorvidos ..	17

2.2.12.	Determinação da temperatura de transição vítrea de micropartículas	19
2.2.13.	Análise morfológica de partículas de pequena dimensão.....	19
2.2.14.	Determinação do teor de água de micropartículas	19
2.2.15.	Avaliação da influência da exposição ao ar em partículas obtidas de diferentes matrizes.....	19
2.2.16.	Determinação da densidade aparente de micropartículas de matrizes diferentes.....	20
3.	Resultados e discussão	21
3.1.	Quantificação de hidroxitirosol e de tirosol nos concentrados de osmose inversa	21
3.1.1.	Estimativa rápida das concentrações de hidroxitirosol e tirosol nos concentrados de osmose inversa através do método de análise de fenóis totais	22
3.2.	Análise da estabilidade do concentrado de osmose inversa	24
3.3.	Estudo da conservação do concentrado de osmose inversa	24
3.4.	Preparação de extratos aquosos e redução do odor avinagrado em concentrados de osmose inversa	27
3.5.	Estudo da conservação de azeites aditivados	32
3.5.1.	Comparação entre azeites <i>Zeyton</i> e <i>NaturOlive azeite</i>	33
3.6.	Estudo das micropartículas obtidas por secagem dos concentrados de osmose inversa.....	35
3.6.1.	Caracterização das partículas e enquadramento da concorrência.....	43
4.	Conclusão.....	53
5.	Bibliografia	55
	Anexos.....	59

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Diagrama genérico do processo de produção do azeite com respectiva composição fenólica dos subprodutos e produto final.	2
Figura 1.2 - Estrutura molecular do hidroxitirosol. ^[14]	2
Figura 1.3 - Estrutura molecular do tirosol. ^[15]	3
Figura 1.4 – Processo de obtenção do concentrado de osmose inversa (RO).	5
Figura 1.5 – Esquema geral das etapas do processo de secagem por atomização. ^[30] ...	7
Figura 1.6 – Equipamento Büchi <i>Mini Spray dryer B-290</i> (à esquerda); Diagrama esquemático da secagem por atomização de um <i>mini spray dryer</i> (à direita). A- Entrada da solução que se pretende secar, B- Entrada do gás de atomização, 1- gás de secagem, 2- Aquecimento do gás de secagem, 3- pulverização da solução, 4- Câmara de secagem; 5- Braço de ligação entre a câmara e o ciclone, 6- Ciclone, 7- Saída de gás de secagem, 8- Copo de recolha do produto final. ^[31]	8
Figura 1.7 – Superfície dos poros do <i>N-Zorbit 2144 DG</i> . ^[32]	9
Figura 3.1 - Relação entre concentração de HT e concentração de fenóis totais.	23
Figura 3.2 - Relação entre concentração de HT+Ty e concentração de fenóis totais.	23
Figura 3.3 – Concentração respectiva de HT e Ty no RO 164 ao longo do tempo.	24
Figura 3.4 – Amostras RO 164 e <i>AquaOlive</i> no início do estudo da conservação.	25
Figura 3.5 - Amostras RO 164 e <i>AquaOlive</i> no fim do estudo da conservação.	26
Figura 3.6 – Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 164 à temperatura ambiente e no mel de RO 164 conservado na estufa.	26
Figura 3.7 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no <i>AquaOlive</i> , no RO 164 evaporado conservado à temperatura ambiente e protegido da luz e no RO 164 evaporado conservado na estufa e protegido da luz.	27
Figura 3.8 – Concentração de HT para RO 161 e RO 164 cada um com glicerol e com etanol, respectivamente.	28
Figura 3.9 – Amostras de RO 161 e RO 164 com glicerol e com etanol, respectivamente (da esquerda para a direita).	28
Figura 3.10 – Amostra de DSS1 evaporado com adição de glicerol.	29
Figura 3.11 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 161 com etanol e respectiva percentagem de eliminação.	29
Figura 3.12 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 161 com glicerol e respectiva percentagem de eliminação.	30
Figura 3.13 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 164 com etanol e respectiva percentagem de eliminação.	31
Figura 3.14 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 164 com glicerol e respectiva percentagem de eliminação.	31
Figura 3.15 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no DSS1 com glicerol e respectiva percentagem de eliminação.	32
Figura 3.16 – Concentração de HT + Ty ao longo de um ano para o azeite aditivado sob solução aquosa a diferentes condições.	33
Figura 3.17 - Concentração de HT + Ty ao longo de um ano para o azeite aditivado com glicerol a diferentes condições.	33
Figura 3.18 - Concentração de HT+Ty nos respectivos azeites <i>Zeyton</i> sem e com glicerol à temperatura ambiente.	34
Figura 3.19 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes em cada azeite conservado à temperatura ambiente.	34
Figura 3.20 – Representação gráfica da composição de cada pó em HT e H ₂ O (cada letra corresponde a diferentes condições e/ ou tipo de matriz utilizada e cada número corresponde à sua réplica).	35

Figura 3.21 – Gráfico de reprodutibilidade dos pós C e F obtidos sob as mesmas condições..	36
Figura 3.22 - Sequência de imagens de degradação do pó F1 (da esquerda para a direita). ...	36
Figura 3.23 – Representação gráfica do teor de HT (em %) ao longo do tempo na tentativa de estudo da estabilidade do pó F1.	37
Figura 3.24 – Aspecto físico dos pós DSS e F1 (respectivamente, da esquerda para a direita).	37
Figura 3.25 – Aspecto não desejado da produção de partículas derivadas do concentrado de RO para temperaturas superiores a 130°C a um nível de azoto de 25 mm.	38
Figura 3.26 – Representação esquemáticas das perdas ocorridas durante o processamento de um extracto proveniente de um RO e de um DSS.	39
Figura 3.27 – Gráfico do perfil do pó H analisado por DSC com respectivos parâmetros de transição vítrea.	41
Figura 3.28 - Gráfico do perfil do pó J analisado por DSC.	42
Figura 3.29 – Microorganismos desenvolvidos no extracto de RO 164.	43
Figura 3.30 – Estado inicial dos pós J e H no teste de exposição ao ar.	43
Figura 3.31 - Estado dos pós J e H passadas uma hora e meia no teste de exposição ao ar.	44
Figura 3.32 - Estado dos pós J e H passado uma semana no teste de exposição ao ar.	44
Figura 3.33 – Cápsula da empresa <i>Derectil Nature</i>	45
Figura 3.34 – Representação gráfica da percentagem de hidroxitirosol nos pós da <i>Zeyton</i> em comparação com o pó <i>NaturOlive</i> . (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem_percentagem de HT esperada)	45
Figura 3.35 – Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol para cada tipo de pó. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem)	46
Figura 3.36 – Representação gráfica da densidade aparente de cada pó. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem_percentagem de HT esperada)	46
Figura 3.37 – Representação do processo de secagem por azoto aplicado a dois pós em simultâneo.	47
Figura 3.38 - Imagens microscópicas dos pós H e N de matrizes diferentes com ampliação x20 e x50. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem_ampliação)	47
Figura 3.39 – Representação gráfica da distribuição em número do pó H com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).	48
Figura 3.40 - Representação gráfica da distribuição em número do pó N com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).	48
Figura 3.41 - Imagens microscópicas dos pós G e DSS da mesma matriz com ampliação x20 e x50. (código: letra do pó_temperatura de entrada no <i>spraydryer</i> _quantidade de HT_ampliação)	49
Figura 3.42 - Representação gráfica da distribuição em número do pó G com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).	50
Figura 3.43 - Representação gráfica da distribuição em número do pó DSS com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).	50
Figura 3.44 - Imagens microscópicas dos pós N, DSS, G e <i>NaturOlive</i> com ampliação x20. (código: letra do pó_quantidade de HT_ampliação)	51
Figura 3.45 - Representação gráfica da distribuição em número do pó das cápsulas <i>NaturOlive</i> com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).	52
Figura 3.46 - Ampliação de um aglomerado presente no pó das cápsulas <i>NaturOlive</i>	52

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Amostras dos diferentes concentrados com a respectiva membrana usada no processo, data de entrega e volume recebido.	11
Tabela 2.2 - Amostras dos dessorvidos com a respectiva data de produção e volume recebido.	11
Tabela 2.3 - Produtos concorrentes com respectiva marca, empresa e quantidade disponibilizada.	12
Tabela 2.4 - Solventes, reagentes e padrões necessários ao desenvolvimento deste trabalho.	12
Tabela 2.5 - Condições de cada amostra no teste da conservação aplicado ao RO 164 e <i>AquaOlive</i>	16
Tabela 2.6 - Representação da matiz e condições correspondentes de cada ensaio.	18
Tabela 3.1 - Área dos picos correspondente a cada concentração em HT.	21
Tabela 3.2 - Área dos picos correspondente a cada concentração em Ty.	22
Tabela 3.3 - Determinação da concentração de hidroxitirosol de uma amostra de concentrado de osmose inversa.	22
Tabela 3.4 - Determinação da concentração de tirosol de uma amostra de concentrado de osmose inversa.	22
Tabela 3.5 - Representação dos valores da concentração de hidroxitirosol no RO 164 evaporado para diferentes condições após 4 meses.	25
Tabela 3.6 - Teores de hidroxitirosol e de humidade de cada pó sob diferentes condições de	38
Tabela 3.7 - Rendimentos relativos à produção dos pós de duração superior a 4,5 horas de operação com valor esperado de 5 % de hidroxitirosol.	40

Abreviaturas e Símbolos

AZHT16114TA – Azeite aditivado sob solução aquosa conservado à temperatura ambiente

AZHT16114F – Azeite aditivado sob solução aquosa conservado a 5°C

AZHT16114E – Azeite aditivado sob solução aquosa conservado a 40°C

AZHT16115TA – Azeite aditivado com adição de glicerol conservado à temperatura ambiente

AZHT16115F – Azeite aditivado com adição de glicerol conservado a 5°C

AZHT16115E – Azeite aditivado com adição de glicerol conservado a 40°C

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

GC – Cromatografia Gasosa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HT – Hidroxitirosol

RO – Concentrado de Osmose Inversa

rpm – rotações por minuto

Ty – Tirosol

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde todos os anos cerca de 17,5 milhões de pessoas morrem vítimas de doenças cardiovasculares (DCV) sendo que este valor representa 31% das mortes a nível mundial. Actualmente esta é considerada a principal causa de morte no mundo. ^{[1] [2]}

Num artigo recentemente publicado pela revista médica *BMC Medicine* encontram-se os resultados de um estudo que permitiu associar uma prevenção primária de doenças cardiovasculares à dieta Mediterrânica. Nesse estudo, foi ainda estimado que 3,9% da incidência total de DCV, 8,5% de incidência de AVC e 12,5% de mortalidade por DCV poderiam ter sido evitadas pelo aumento da adesão à dieta mediterrânica. ^[3] De facto, os benefícios associados a este regime alimentar já são bem conhecidos principalmente pela sua relação com a diminuição do risco de mortalidade. ^[4]

A dieta Mediterrânica é caracterizada pelo elevado consumo de peixe, vegetais, leguminosas, cereais integrais e frutas. No entanto, o consumo de gorduras insaturadas é igualmente elevado e representa 40% da ingestão calórica sendo o azeite a sua principal fonte. ^[5]

O azeite destaca-se dos restantes alimentos constituintes da dieta acima mencionada por apresentar largas quantidades de compostos com elevada actividade antioxidante. Por sua vez, está comprovado que estes compostos são responsáveis por uma série de actividades biológicas que contribuem principalmente para a prevenção das doenças cardiovasculares. ^[6]

Como produto derivado da Oliveira, o azeite é uma gordura vegetal cujo seu processo de produção tem vindo a ganhar maior destaque ao longo dos anos, principalmente devido ao descarte de cerca de 79% de matéria constituinte do bagaço, rica em compostos antioxidantes, que pode ser aproveitada e apresentar inúmeras aplicações no ramo da indústria alimentar e farmacêutica. ^{[7] [8]}

1.1. Valorização do bagaço de azeitona

Como subproduto gerado na produção de azeite, o bagaço, é uma importante fonte natural de compostos com elevada capacidade antioxidante, como o hidroxitirosol, tirosol e outros compostos fenólicos. ^[9]

Segundo *Lesage-Meessen et al.*, é possível obter um bagaço rico em hidroxitirosol com uma concentração entre 10 a 100 vezes superior à encontrada no azeite. ^[10] De facto, vários estudos revelaram que o azeite contém, na sua composição, apenas 2% de fracção fenólica da azeitona e, os restantes 98% dos fenóis totais encontram-se nos subprodutos da indústria oleícola (ver **figura 1.1**). ^[11]

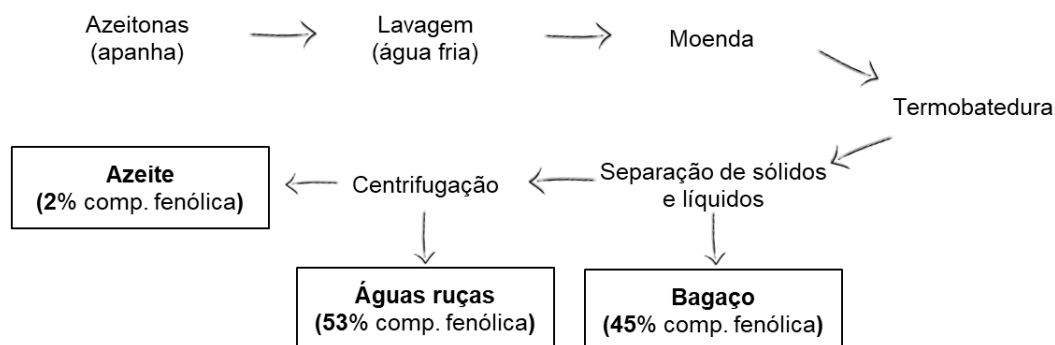


Figura 1.1 - Diagrama genérico do processo de produção do azeite com respectiva composição fenólica dos subprodutos e produto final.

Como se pode observar pela ilustração anteriormente mencionada, o bagaço apresenta uma composição fenólica bastante superior à encontrada no azeite. Contudo, a quantidade encontrada nas águas ruças consegue ainda uma percentagem de 53%.

O descarte das águas ruças tornou-se um problema ambiental grave para as agro-indústrias de grandes dimensões nomeadamente por impedirem a germinação e, como tal passaram a ser desenvolvidos lagares ecológicos nos quais apenas se obtêm dois produtos finais, o azeite e um subproduto que resulta da mistura das águas ruças com o bagaço, originando um efluente bastante aquoso – o *bagaço húmido* ou *lamassa*.^[12] Este tipo de lagares, para além de diminuir o resíduo produzido através da redução da quantidade de água necessária ao processo, também proporciona uma maior composição fenólica no bagaço obtido.

O forte potencial que o bagaço pode apresentar no que diz respeito à sua composição e à obtenção de produtos capazes de prevenir as doenças de larga incidência e morbilidade mencionadas no início deste capítulo tornou-se o principal motor que levou ao crescente interesse da comunidade científica pelos compostos fenólicos, nomeadamente o hidroxitirosol.

1.2. Origem e estrutura química do hidroxitirosol e do tirosol

De entre a variedade de fenóis conhecidos, o hidroxitirosol (HT) tem despertado um maior interesse por ser um dos mais poderosos antioxidantes naturais com uma capacidade comprovada de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) bastante superior face à vitamina C ou à vitamina E.^[13]

De nome IUPAC 4-(2-hidroxietil)-1,2-benzenodiol, a molécula acima mencionada é um metabolito secundário da planta *Olea europaea* (a oliveira) e é crucial na protecção dos seus frutos. A sua estrutura e massa molecular encontram-se representados na **figura 1.2** e pode apresentar-se na forma livre ou combinada.

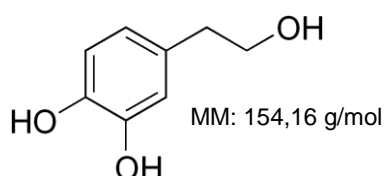


Figura 1.2 - Estrutura molecular do hidroxitirosol.^[14]

Um outro agente igualmente capaz de inibir a oxidação de outras moléculas é o tirosol (Ty, ver **figura 1.3**) ou 4-(2-Hidroxietil) fenol que é tão abundante no bagaço quanto o hidroxitirosol e que, tal como este, também pode ocorrer sob a forma conjugada.

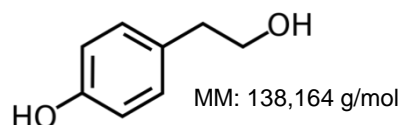


Figura 1.3 - Estrutura molecular do tirosol. ^[15]

Segundo *Obied et al.* ^[16] os conjugados fenólicos mais importantes na oliveira são a Oleuropeína e o Ligustrosídeo, que são ésteres do ácido elenólico com hidroxitirosol e tirosol, respectivamente. Na **tabela 1.1** é possível observar a estrutura de tais conjugados e compreender que nesta forma o ácido elenólico se encontra ligado ao respectivo álcool e a uma molécula de glucose.

Tabela 1.1 – Estrutura e massa molecular e fórmula e nome químico dos principais conjugados fenólicos da azeitona. Adaptado do jornal “*The Royal Society of Chemistry 2008*”. ^[16]

Nome genérico	Ácido elenólico	Oleuropeína	Ligustrosídeo
Estrutura molecular			
Massa molecular (g/mol)	242	540	524
Fórmula química	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂
Nome químico	(2S,3S,4S)-3-Formil-5-(metoxycarbonil)-2-metil-3,4-dihidro-2H-piran-4-ácido acético	(2S,3E,4S)-3-Etilideno-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-5-(metoxycarbonil)-2H-piran-4-ácido acético 2-(3,4-dihidroxifenil) etil éster	(2S,3E,4S)-3-Etilideno-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-5-(metoxycarbonil)-2H-piran-4-ácido acético 2-(4-hidroxifenil) etil éster

Os fenóis referidos anteriormente representam apenas uma pequena amostra dos até agora identificados, salientando-se o facto de o termo “polifenol” incluir mais de 8000 compostos. Tanto a Oleuropeína como o Ligustrosídeo podem sofrer uma variedade enorme de transformações químicas e originar uma série de derivados para além dos acima mencionados. ^{[16] [17]}

No período de maturação da azeitona e durante o processamento da mesma até ao produto final (o azeite), é a actividade enzimática a principal responsável por tais transformações químicas e, desta forma, o HT e Ty livres surgem como produtos de hidrólise.

1.3. Compostos fenólicos e a saúde humana

O organismo humano é caracterizado pela sua complexidade de mecanismos interligados dos quais se destacam a respiração aeróbica e o metabolismo celular responsáveis por actividades indispensáveis e que acabam por desencadear a formação de radicais livres. Estes radicais, nomeadamente espécies reactivas de oxigénio, são naturalmente combatidos pelo organismo através da activação de mecanismos antioxidantes. Contudo, quando existe um desequilíbrio nesta compensação sobrecarregando estes mecanismos (o chamado *stress oxidativo*) surge um aumento da probabilidade de ocorrência de doenças degenerativas através da peroxidação dos lípidos de membrana; da agressão: às proteínas (dos tecidos e das membranas), às enzimas e aos hidratos de carbono; e, da oxidação do DNA.^[18]

A descoberta de compostos bioactivos nas plantas, os fitoquímicos, responsáveis pela protecção das mesmas contra a oxidação^[19], desencadeou uma série de estudos no sentido de identificar tais compostos e de haver uma possível relação destes com a protecção contra o *stress oxidativo* no organismo humano. Inicialmente acreditou-se que o ácido oleico fosse o principal responsável por tais funções protectoras, sobretudo por ser abundante no azeite e este representar a principal fonte de gordura insaturada na dieta mediterrânea. Contudo, rapidamente se concluiu que, apesar do ácido oleico apresentar benefícios (já comprovados) para a saúde humana, este não era o agente crucial na protecção contra a oxidação. Aliás, em 2006 num artigo de revisão do grupo Covas *et al.*, sublinhou-se que a abundância deste composto no plasma sanguíneo dos europeus do norte e do sul (regiões com maior e menor incidência de doenças degenerativas, respectivamente) não revelava diferenças significativas.^{[6] [20]} Este artigo valorizou ainda substâncias minoritárias presentes no azeite, os compostos fenólicos, evidenciando a existência de ligações que eram estabelecidas entre estes álcoois e as partículas lipídicas de baixa densidade (LDL). As partículas LDL são transportadoras de colesterol no sangue e, quando se encontram oxidadas levam, muitas das vezes, ao surgimento de aterosclerose ou DCV. Assim, ao estarem ligadas a álcoois fenólicos ficam protegidas contra eventuais “ataques” de radicais livres.

Os benefícios associados ao efeito antioxidante apresentado por estes compostos vieram a ser reforçados, ainda no ano 2006, pelo mesmo grupo de Covas em conjunto com outros investigadores, através da publicação de resultados relativos a um extenso conjunto de ensaios clínicos onde se evidenciou a contribuição dos fenóis do azeite na redução do aparecimento de doenças cardiovasculares.^[21] A verdade é que os resultados destes ensaios, em conjunto com outros de pequena escala, permitiram que, a EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos), em 2011, desse entrada principal a declarações de saúde relacionadas a polifenóis na azeitona^[22]. Destas declarações, expressas resumidamente abaixo, salienta-se a 1ª que resultou da comprovação *in vivo*:

- Protecção das partículas de LDL de danos oxidativos (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865);
- Manutenção das concentrações normais do sangue de HDL-colesterol (ID 1639);
- Manutenção da normal pressão arterial (ID 3781);
- "Propriedades anti-inflamatórias" (ID 1882);
- "Contribui para a saúde do trato respiratório superior" (ID 3468);
- "Pode ajudar a manter a função normal do trato gastrointestinal" (ID 3779);
- "Contribui para as defesas do organismo contra agentes externos " (ID 3467).^[23]

1.4. Processo de obtenção do extracto rico em hidroxitirosol

Foi sobretudo a credibilidade dos ensaios clínicos de *Covas et al.* que despertou desde logo a busca por mecanismos que permitissem separar, purificar e concentrar o hidroxitirosol e seus derivados a partir de vários produtos provenientes da Oliveira, sobretudo dos que representam mais baixo valor económico. Desta forma, o bagaço revelou ser o melhor material para extracção do hidroxitirosol, reflectindo-se num aumento da sua procura. Este aumento deveu-se essencialmente ao forte potencial que o bagaço pode apresentar no que diz respeito à sua composição fenólica, descrito na secção 1.1.

Posto isto, tornou-se importante saber que o enriquecimento do bagaço nestes compostos acontece não só devido a ligações, glucosídicas ou outras, às paredes celulares ou outros materiais sólidos mas essencialmente por partilha para a fase aquosa quando esta é separada do azeite. Também o facto de o bagaço ser frequentemente armazenado em grandes depósitos ao ar livre proporciona o aumento de álcoois fenólicos livres uma vez que este passa por várias transformações químicas, hidrólises e oxidações, geralmente catalisadas por enzimas.^[20]

Vários métodos têm sido aplicados desde então com o objectivo de extrair estes compostos que se apresentam sob a forma livre. Em 2008, o grupo *Nunes da Ponte et al.*^[24] desenvolveu um processo patenteado de obtenção de um concentrado de HT o qual compreende três etapas: extracção, nanofiltração e osmose inversa (**figura 1.4**).

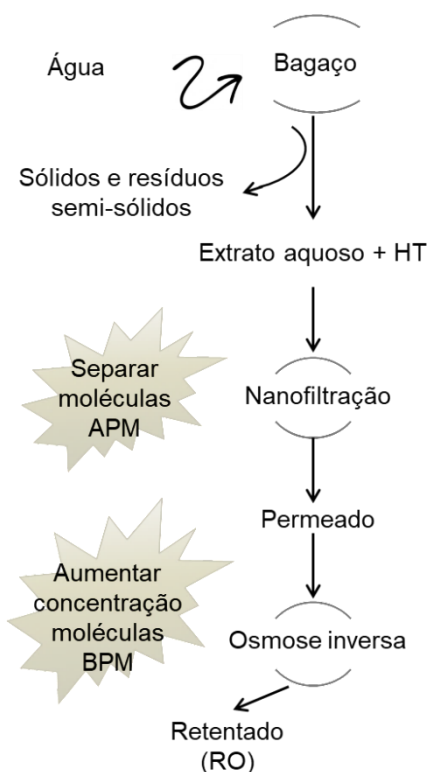


Figura 1.4 – Processo de obtenção do concentrado de osmose inversa (RO).

A primeira etapa consiste no processamento de um bagaço de azeitona, fornecido pela empresa AZAL (Redondo, Portugal), por extracção de compostos bioactivos com água ou uma mistura hidroalcoólica. A segunda etapa traduz-se na alimentação do extracto aquoso obtido à unidade de nanofiltração, onde se dá a separação de compostos de alto peso molecular (APM),

os quais ficam retidos, dos de baixo peso molecular (BPM). Por fim, os compostos bioactivos que ficam no permeado são alimentados a uma unidade de osmose inversa, a qual tem como finalidade aumentar a concentração dos mesmos. O retentado obtido na última etapa do processo é designado o concentrado de osmose inversa (RO) e inclui compostos como hidrocarbonetos, tocoferóis, esteróis, álcoois gordos, compostos fenólicos, compostos voláteis e pigmentos. A corrente aquosa obtida no processo pode ser novamente usada na etapa de extracção ou disposta no ambiente.

É importante referir que para além do hidroxitirosol vários são os compostos fenólicos comuns neste tipo de extractos, nomeadamente hidroxitirosol glicol, tirosol, ácido 5-O-cafeoilquínico, derivado de verbascosídeo, verbascosídeo, luteolina 7-O-glucósido, rutina, apigenina 7-O-glucósido e apigenina.^[25]

No extracto utilizado para a presente dissertação, para além do HT e do Ty presentes em grande quantidade, também se tornou importante estudar a presença de voláteis responsáveis por odores indesejáveis e característicos do RO, assim, ao longo deste trabalho irão ser particularmente analisados os principais responsáveis pelo cheiro avinagrado, ranço, alcatrão e avinhado, sendo eles o ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilphenol, respectivamente.

O processo anteriormente mencionado, para além de permitir uma concentração em HT no extracto de 15% a 98% de fracção molar, recorre somente ao uso de tecnologias limpas. No desenvolver deste trabalho, o concentrado RO utilizado é proveniente deste processo patenteado.

Outros processos surgiram posteriormente na tentativa de aplicação do extracto na indústria alimentar dos quais se destacam: o “extractor de solvente acelerado” (ASE) cujo solvente utilizado é uma mistura água-etanol;^[26] a “extração líquida pressurizada” (PLE) considerando a mesma mistura anteriormente mencionada (etanol e água)^[27] e, a “extração em batch otimizada” na qual se utiliza o acetato de etilo como solvente.^[28]

1.5. Aplicações do concentrado da osmose inversa

O grande objectivo na obtenção de um concentrado rico em hidroxitirosol foi sobretudo o desenvolvimento de produtos alimentares passíveis de serem comercializados. Nos subcapítulos seguintes é possível encontrar as aplicações deste extrato que se traduzem na preparação de azeites aditivados e micropartículas do concentrado de osmose inversa para cápsulas de gelatina, 1.5.1 e 1.5.2., respectivamente.

1.5.1. Preparação de azeites aditivados

A necessidade da formulação de azeites aditivados surgiu quando se constatou que raramente os azeites comerciais atingiam a dose mínima exigida pela EFSA de hidroxitirosol, tirosol e seus derivados - 5 mg por cada 20 g de azeite. Em 2015, a empresa *Zeyton nutraceuticals* conseguiu, com sucesso, obter um azeite aditivado com este valor mínimo apresentando estabilidade por um período de pelo menos 3 meses.^[20] Esta estabilidade oxidativa já tinha sido evidenciada em 2013 por *Mosca et al.*^[29] onde, em comparação com outros extractos com propriedades antioxidantes, a emulsão à base de azeite demonstrou ser a única a apresentar estabilidade na presença do radical 2,20 - azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) a 40°C num período de 6 horas. Desta forma ficou demonstrado que para além das propriedades saudáveis

dos fenóis eles ainda podem desempenhar um papel importante na estabilização oxidativa de emulsões à base de azeite.

Um dos objectivos deste trabalho reside na conclusão de um estudo de estabilidade de um azeite aditivado sob a forma de solução aquosa e outro com adição de glicerol a diferentes condições. Desta forma, irá ser estudada a estabilidade do hidroxitirosol e do tirosol por um período de 1 ano. Para além desta análise irá também ser enquadrado o estudo de um azeite recentemente elaborado pela empresa *Deretil Nature*.

1.5.2. Micropartículas do concentrado de osmose inversa para cápsulas de gelatina

As micropartículas de RO consistem na secagem do concentrado de osmose inversa com o objectivo de formular cápsulas de gelatina ricas em hidroxitirosol. Vários são os processos de secagem utilizados dos quais se destaca a secagem por atomização (ou secagem por aspersão, “*spray drying*”). Esta é a técnica mais recorrente para fabricação de géneros alimentícios sobretudo devido à sua produção contínua, facilidade de industrialização, baixo custo, disponibilidade de equipamentos e principalmente devido ao curto tempo de residência do extracto na câmara de secagem.

O processo de secagem por atomização consiste essencialmente em 4 etapas como se pode observar no esquema geral da **figura 1.5**. Na primeira o extracto é disperso como gotículas, criando uma grande área superficial. Na segunda ocorre contacto com uma corrente de gás aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa dá-se a evaporação do solvente originando a última etapa, a formação de uma partícula sólida.^[30]



Figura 1.5 – Esquema geral das etapas do processo de secagem por atomização.^[30]

As partículas de RO são caracterizadas por serem de natureza higroscópica, isto é, com elevada capacidade para absorver água, o que aumenta a coesão entre as partículas. Assim, estas propriedades podem afectar as características do produto no final. Neste caso, é comumente adicionado, ao extracto, um adjuvante de secagem para que as partículas finais não assimilem água, sendo que este deve estar bem dissolvido no extracto antes da secagem. Estes adjuvantes, como a maltodextrina ou o amido aumentam a estabilidade do produto final e devido às suas propriedades higroscópicas melhoram o rendimento da secagem.

Na figura que se segue encontra-se um exemplo de um equipamento de secagem por atomização à escala laboratorial assim como o respectivo diagrama esquemático.

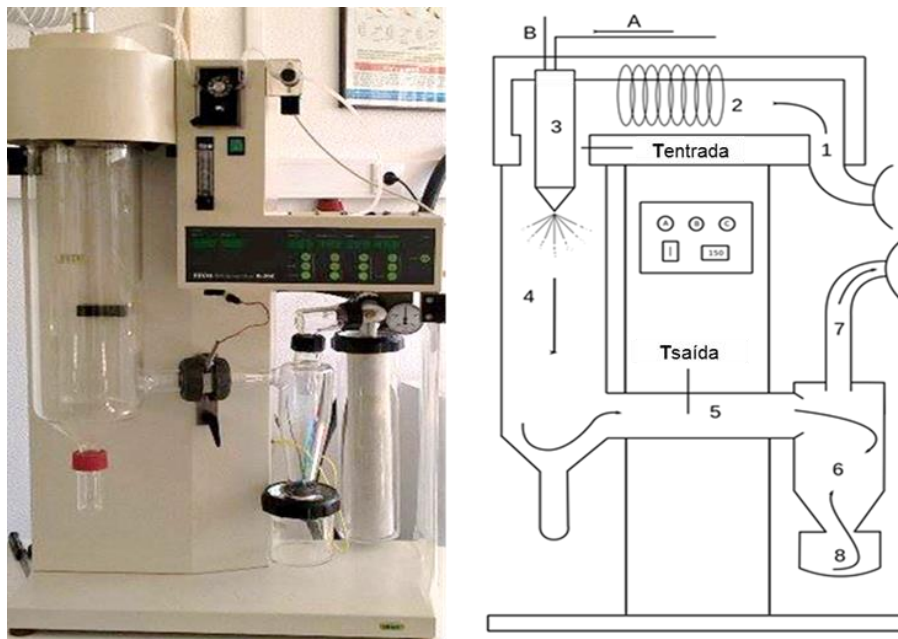


Figura 1.6 – Equipamento Büchi *Mini Spray dryer B-290* (à esquerda); Diagrama esquemático da secagem por atomização de um *mini spray dryer* (à direita). A- Entrada da solução que se pretende secar, B- Entrada do gás de atomização, 1- gás de secagem, 2- Aquecimento do gás de secagem, 3- pulverização da solução, 4- Câmara de secagem; 5- Braço de ligação entre a câmara e o ciclone, 6- Ciclone, 7- Saída de gás de secagem, 8- Copo de recolha do produto final. ^[31]

Pela observação da figura anterior é possível compreender todo o funcionamento do **Büchi Mini Spray dryer B-290**. As etapas de obtenção das partículas sólidas mencionadas anteriormente ocorrem na câmara de secagem (4) sendo que estas são posteriormente encaminhadas para o ciclone (6) através de um fluxo de ar quente acabando por cair no copo de recolha (8) através de um mecanismo de remoção de campo electrostático gerado nas partículas.

Este equipamento é apenas utilizado para ensaios em pequena escala contudo é importante referir que os *spray dryer's* à escala industrial se tornam muito mais eficientes. De qualquer das formas este tipo de equipamentos é bastante vantajoso sobretudo devido à sua produção em contínuo e por ser possível estabelecer as condições de operação desejáveis. Assim, é possível manipular parâmetros tais como a temperatura, caudal de azoto, caudal de alimentação e o teor de sólidos.

Recentemente foi lançado, no mercado, um material adsorvente, o **N-Zorb[®] 2144 DG**, capaz de transformar um extracto aquoso em pó. Este produto apresenta propriedades higroscópicas bastante superiores às da tradicional maltodextrina. Assim, 100 g deste produto é capaz de secar 70 g de material activo traduzindo-se numa capacidade de retenção que chega até aos

40% face à maltodextrina que se encontra entre os 10 e os 15%.^[32] Na figura que se segue é possível ver a superfície dos poros do **N-Zorbit** que lhe confere estas propriedades.



Figura 1.7 – Superfície dos poros do *N-Zorbit 2144 DG*.^[32]

Derivado do milho ceroso, o *N-Zorbit* foi aprovado pelo mercado da União Europeia e apesar de a secagem por pulverização conferir uma protecção adicional ao extracto, a adição de *N-Zorbit* pode ser uma boa alternativa à secagem, sobretudo devido à redução de custos. Este produto é ainda indicado para extractos difíceis de secar, como é o caso do RO.

No desenvolver deste trabalho irão ser analisadas e caracterizadas as micropartículas de RO para posterior formulação de cápsulas de gelatina passíveis de serem comercializadas. Desta forma, as micropartículas estudadas foram obtidas a diferentes condições no **Büchi Mini Spray dryer B-290**. Sendo que este novo produto lançado no mercado poderá ser uma boa alternativa futura na secagem do extracto RO. Ainda no seguimento deste trabalho irá ser analisada uma amostra de cápsulas da empresa *Derectil Nature* assim como também irá ser estudado um extracto rico em hidroxitirosol "*Water and fat soluble honey*" da empresa *Genosa*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Concentrados do processo de osmose inversa

Para a realização deste trabalho foram utilizados extractos naturais obtidos segundo o processo patenteado descrito na secção 1.4 do qual se obtém um retentado que ao longo do trabalho é expresso com o código RO. É importante mencionar que a variação dos factores e das condições de produção se traduz em diferentes tipos de RO.

Na **tabela 2.1** encontram-se as amostras dos concentrados de RO fornecidos pela empresa AZAL e que foram utilizados ao longo do trabalho com a respectiva membrana aplicada ao processo, data de entrega à FCT e volume recebido.

Tabela 2.1 - Amostras dos diferentes concentrados com a respectiva membrana usada no processo, data de entrega e volume recebido.

Amostras	Membrana (NF)	Data de entrega	Volume recebido (L)
RO6	DK	-	-
RO8		16-10-2015	-
RO161		27-04-2016	20
RO162	NF270	27-05-2016	80
RO163		17-06-2016	60
RO164		14-07-2016	60
RO165		05-12-2016	0,5
RO166		05-12-2016	0,5
RO167		05-12-2016	0,5
RO168		05-12-2016	0,5

2.1.2. Dessorvidos do processo de adsorção/dessorção

Os dessorvidos (DSS) usados neste trabalho, fornecidos pela empresa *Zeyton Nutraceuticals*, foram obtidos através de um processo de purificação do RO (alheio a este trabalho). Para tal, o concentrado de osmose inversa foi submetido a um passo de adsorção através da adição de resina, do qual a mesma foi posteriormente extraída e lavada com água. Por fim, uma mistura de solventes biocompatível à base de água foi adicionada à resina e desta forma se obteve uma solução designada DSS.^[33]

Na **tabela 2.2** encontram-se os dessorvidos usados com a respectiva data de produção e volume recebido.

Tabela 2.2 - Amostras dos dessorvidos com a respectiva data de produção e volume recebido.

Amostras	Data de produção	Volume recebido (L)
DSS1	25/01/2016	2,50
DSS2	19/06/2017	2,98

2.1.3. Azeites

Foram utilizados dois azeites aditivados os quais foram preparados fora do âmbito deste trabalho assim como o início do seu estudo. Cada azeite estava a ser testado em três condições diferentes: temperatura ambiente e luz (20 ± 10 °C), frigorífico (aprox. 5 °C) e estufa (aprox. 40 °C). A grande diferença entre eles é a presença/ausência de glicerol.

2.1.4. Produtos concorrentes

As amostras de produtos utilizados como modelo de comparação no desenvolver da presente tese de mestrado apresentam-se na **tabela 2.3**, assim como a respectiva marca, empresa e quantidade disponibilizada.

Tabela 2.3 - Produtos concorrentes com respectiva marca, empresa e quantidade disponibilizada.

Produto	Marca	Empresa	Quantidade
<i>Water and fat soluble honey</i>	AquaOlive	Genosa	30 gramas
<i>NaturOlive azeite</i>	NaturOlive	Deretil Nature	20 mililitros
<i>NaturOlive cápsulas</i>			5 unidades

2.1.5. Solventes, reagentes e padrões

Na **tabela 2.4** apresentam-se os solventes, reagentes e padrões que foram necessários para o desenvolvimento deste trabalho, assim como o respectivo registo CAS, a pureza e a marca dos mesmos.

Tabela 2.4 - Solventes, reagentes e padrões necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Material	CAS	Pureza (%)	Marca
Acetona	67-64-1	≥ 99,8	Sigma Aldrich
Ácido Acético Glacial	200-580-7	100	Merck
Ácido Gálico Monohidratado	5995-86-8	≥ 98	Alfa Aesar
Ácido Sulfúrico	7664-93-9	95-97	Fluka
Azoto	7727-37-9	-	Air Liquide
Carbonato de Sódio	497-19-8	-	Honeywell
Etanol	64-17-5	96	Carlo Erba
Fenol	108-95-2	99,0-100,5	Sigma Aldrich
Glicerol	56-81-5	≥ 99,0	Sigma Aldrich
Glucose	50-99-7	≥ 99,5	Sigma Aldrich
Hidroxitirosol	10597-60-1	≥ 98	ExtraSynthese
Hydranal-Coulomat AG	-	-	Honeywell
Metanol	67-56-1	≥ 99,9	Carlo Erba
Reagente Folin-Ciocalteu	-	-	Sigma Aldrich
Tirosol	501-94-0	98	Sigma Aldrich

2.2. Métodos

2.2.1. Quantificação de fenóis totais em concentrados de osmose inversa

Para a quantificação de fenóis totais foi aplicado, a uma amostra de cada RO (mencionado na secção 2.1.1.), o método colorimétrico *Folin-Ciocalteu* de *Waterhouse* ^[34] no qual se preparou inicialmente uma solução *stock* de ácido gálico monidratado com água destilada numa concentração de 5 g/L.

Da solução *stock* anteriormente preparada foram produzidas oito soluções padrão de concentração 50, 100, 150, 250, 350, 500, 650 e 800 mg/L respectivamente, de modo a obter uma recta de calibração na qual o branco utilizado foi água destilada.

Numa primeira etapa foram retirados 20 µL de amostra/ solução padrão/ branco para um vial. Posteriormente foram adicionados água destilada numa quantidade de 1,58 mL e, de seguida, 100 µL de reagente *Folin-Ciocalteu*. A mistura resultante foi incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente, sendo que após este tempo, foram adicionados 300 µL de carbonato de sódio. A mistura foi imediatamente colocada num banho-maria a 40°C durante 30 min.

Para finalizar procedeu-se à medição das absorvâncias num comprimento de onda de 750 nm no espectrofotómetro **Thermo Scientific Evolution 201** com o software **Thermo Fisher Scientific 2.1.133**. A concentração de fenóis totais presente em cada amostra foi determinada através do uso da equação obtida pela recta de calibração expressa em mg/L GAE (equivalentes de ácido gálico).

2.2.2. Avaliação da quantidade de hidroxitirosol e tirosol presente em concentrados e dessorvidos

De modo a quantificar as moléculas de hidroxitirosol e/ou tirosol, a cada RO mencionado na secção 2.1.1. foi aplicado o método de análise por HPLC. Para tal foram necessários dois aparelhos: **Thermo Scientific Surveyor** com o software **Thermo Chromquest 5.0 V.3.2.1** e **Agilent Technologies** com o software **Chemstation OpenLab C.01.07 SR3 [465]**. A coluna utilizada foi uma coluna **Waters Novapak C18** (150 x 3,9 mm) e foi mantida a uma temperatura constante de 25°C. A fase móvel consistiu de um sistema binário usando 10% metanol e 2% ácido acético em água ultra pura Tipo I. O volume de injeção foi de 25 µl com um caudal de 0,5 mL/min. A deteção e quantificação foram realizadas a 280 nm em ambos os aparelhos sendo que a curva de calibração foi injetada no início da corrida.

2.2.3. Quantificação de voláteis em concentrados de osmose inversa e em dessorvidos

Por forma a determinar a quantidade de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes nas amostras de concentrados de osmose inversa, as mesmas foram sujeitas a análise de cromatografia gasosa (GC) por headspace acoplada a espectrometria de massa (MS).

Nas alíneas que se seguem encontra-se descrito o procedimento adoptado para a extracção por headspace tipo HS-SPME e as condições aplicadas ao sistema GC/MS, respectivamente alíneas a) e b).

a) Extração por Headspace-SPME (HS-SPME)

As extracções SPME foram realizadas utilizando uma fibra de carboxen/ divinilbenzeno/ polidimetilsiloxano (CAR / DVB / PDMS) de 1 cm com 50/30 µm de espessura de película (df) fornecida pela **Supelco**, Bellefonte, PA, EUA. Antes de usar, a fibra foi acondicionada de acordo com as recomendações do fabricante. Os espaços em branco da fibra foram executados periodicamente para garantir a ausência de contaminantes. As amostras, com 4,0 mL de volume cada, foram introduzidas num vial de 22,0 mL e seladas com um septo (de borracha revestido com teflon) acondicionado numa tampa de metal magnética. O frasco foi equilibrado durante 10 min a 50°C procedendo-se à extracção que se deu por 50 minutos à mesma temperatura. A dessorção térmica dos analitos foi realizada expondo a fibra no orifício de injeção de GC a 260°C durante 3 minutos em modo *Splitless*.

b) Condições do Sistema GC/MS

As análises foram realizadas num cromatógrafo gasoso **Bruker Scion 456-GC** acoplado a um espectrómetro de massa triplo quadrupolo (TQ). Foi utilizado um injetor de amostras automático: **CTC Analysis autosampler CombiPAL**. Os dados foram adquiridos com **MSWS 8.2 Bruker** e analisados com **Bruker MS Data Review 8.0**. Para a separação cromatográfica foram utilizadas duas colunas capilares **ZB-WAX PLUS** (60 mx 0,32 mm id, 1 µm df) seguida de uma coluna capilar **ZB-5 MS** (30 mx 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm df), fornecidos pela **Phenomenex**, Torrance, CA, EUA. Estas colunas sofreram duas alterações no decorrer do trabalho, sendo que a primeira alteração foi a utilização de apenas uma coluna **ZB-WAX PLUS** (em vez das duas) e a segunda foi o uso de uma coluna **DB-5 MS** (30 mx 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm df) em vez da coluna **ZB-5 MS**. A temperatura inicial do forno foi de 40°C, permanecendo nesta 5 min, seguida por uma rampa de aquecimento a uma taxa de 4°C/min até 240°C, permanecendo 15 min. Foi utilizado hélio como gás de corrida a um fluxo constante de 1,70 mL/min. A linha de transferência de MS e as temperaturas da fonte foram fixadas em, respectivamente, 240°C e 220°C. Os espectros eram compatíveis com o programa **NIST MS Search Program 2.0 g**. Para determinar os tempos de retenção e os fragmentos de massa característicos, a ionização eletrónica (EI) aos 70 eV dos espectros de massa dos analitos foi registrada a full scan na gama dos 40 aos 450 m/z.

2.2.4. Quantificação de hidratos de carbono no concentrado e no dessorvido

De forma a quantificar os hidratos de carbono presentes no concentrado (RO 164) foi aplicado o método *Fenol-Sulfúrico* ^[35]. Para tal foi inicialmente preparada uma solução *stock* de glucose monoidratada (ver secção 2.1.5.) com água destilada numa concentração de 1g/L.

Da solução anteriormente preparada foram produzidas oito soluções padrão de concentração 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,65; 0,85 e 1 g/L respectivamente, de modo a obter uma recta de calibração na qual o branco usado foi água destilada.

Num primeiro passo retirou-se 500 µL de amostra/ solução padrão para um tubo de ensaio. De seguida foram adicionados 1,5 mL de ácido sulfúrico e 300 µL de fenol. Imediatamente, a mistura, foi bem agitada num vortex e incubada num banho a seco (**Accu Block™ Digital Dry**

Bath) durante 5 minutos a 90°C. Após esse tempo a mistura foi retirada e arrefecida à temperatura ambiente através da sua imersão num banho de água.

Por fim procedeu-se à medição das absorvâncias num comprimento de onda de 490 nm no espectrofotómetro **Thermo Scientific Evolution 201** com o software **Thermo Fisher Scientific 2.1.133**. Os resultados obtidos foram determinados através do uso da equação obtida pela recta de calibração expressa em g/L GE (equivalentes de glucose).

Para quantificar os hidratos de carbono nas amostras de adsorvido (DSS1 e DSS2) o procedimento foi igual ao anteriormente descrito com a excepção do uso de água destilada como solvente, que passou a ser uma mistura água-etanol (1:1). Desta forma, tanto a solução stock como as soluções padrão e o branco foram preparadas com recurso à mistura anteriormente mencionada.

2.2.5. Estimativa rápida das concentrações de hidroxitirosol e tirosol nos concentrados de osmose inversa

Com o intuito de se obter uma estimativa rápida da quantidade de hidroxitirosol e tirosol presente nos concentrados de osmose inversa foram aplicados os métodos *Folin-Ciocalteu* (descrito na secção 2.2.1.) e HPLC (ver secção 2.2.2.) e estabelecida a relação desenvolvida no âmbito da tese de Marta Marques.^[33]

2.2.6. Análise da estabilidade do concentrado de osmose inversa

A análise da estabilidade foi aplicada ao RO 164 e, de forma a entender o perfil da quantidade de hidroxitirosol ao longo do tempo no extracto, uma amostra do mesmo foi regularmente enviada para análise HPLC (ver secção 2.2.2.).

2.2.7. Estudo da conservação do concentrado

O estudo da conservação foi aplicado ao extracto RO 164. Numa primeira fase foram inseridos 100 mL de RO164 num balão de fundo redondo e, posteriormente, este foi ligado a um evaporador rotativo **Heidolph vv2000**. A 120 rpm num banho a 35 °C (**Büchi 461 water bath**), o extracto foi evaporado até ao estado de mel. Este procedimento foi repetido 4 vezes, sendo que o produto final após cada secagem foi inserido num vial de 10 mL.

Após a preparação das amostras estas foram submetidas a diferentes condições à excepção de uma delas que foi sujeita a análise HPLC descrita na secção 2.2.2. com o intuito de quantificar o hidroxitirosol no início do estudo.

As amostras foram semanalmente fotografadas de forma a detectar uma possível alteração no aspecto das mesmas.

Na **tabela 2.5** é possível, não só, observar o volume obtido de cada amostra de RO e as diferentes condições a que foi sujeito, como também as condições a que o produto da concorrência, *AquaOlive*, foi submetido.

Tabela 2.5 - Condições de cada amostra no teste da conservação aplicado ao RO 164 e *AquaOlive*.

Amostra	Código	Temperatura (°C)	Presença de Luz
1	RO164 Luz T.A.	+/- 25	Sim
2	RO164 Escuro T.A.	+/- 25	Não
3	RO164 Frio	5	Não
4	RO164 Estufa	40	Não
5	<i>AquaOlive</i>	+/- 25	Não

Ao fim de 4 meses, cada amostra foi novamente submetida a análise HPLC. As amostras conservadas na estufa, à temperatura ambiente e o *AquaOlive* foram, ao fim do tempo anteriormente referido, submetidas a análise de cromatografia gasosa (GC) descrita na secção 2.2.3.

2.2.8. Preparação de extractos aquosos com a adição de etanol em concentrados de osmose inversa

A elaboração de extractos homogéneos com etanol foi aplicada ao RO 161 e ao RO 164. Assim, para cada concentrado o procedimento foi o mesmo. Inicialmente foi pesado um balão de fundo redondo de 250 mL numa balança analítica - **Kern 572** - registando-se o valor. De seguida foram introduzidos 100 mL de RO para o balão, registando-se novamente o peso do mesmo. Posteriormente, num evaporador rotativo **Heidolph vv2000** a cerca de 120 rpm num banho a 35°C (**Büchi 461 water bath**), o concentrado foi evaporado até à secura, tendo uma duração de 2h. Após esse tempo, o peso do balão foi novamente registado e foram adicionadas 40 gramas de etanol. A solução final foi guardada num vial e devidamente identificada.

De forma a quantificar o teor em hidroxitirosol e, por forma a detectar algum odor indicador da presença de ácido acético, cada solução guardada foi sujeita ao método HPLC (ver secção 2.2.2.) e ao método GC (ver secção 2.2.3.), respectivamente.

2.2.9. Preparação de extractos aquosos com a adição de glicerol em concentrados de osmose inversa

A elaboração de extractos homogéneos com glicerol foi aplicada ao RO 161, ao RO 164 e ao DSS1. O procedimento foi igual ao descrito na secção 2.2.8. para a incorporação com etanol à excepção da substituição da adição de etanol por glicerol.

2.2.10. Estudo da conservação de azeites aditivados

Para o teste da conservação de azeites aditivados com e sem glicerol foi, a cada mês, aplicado o método que a seguir se apresenta.

Para cada condição (ver secção 2.1.3.) foram inicialmente pesadas 5 g de azeite com glicerol para um gobelé e 5 g de azeite sem glicerol para outro gobelé. A cada um foi adicionado 10 mL de metanol e, imediatamente, as soluções foram agitadas, cada uma com o auxílio de uma placa de agitação, a 700 rpm, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se à centrifugação (**SETA-IEC oil test centrifuge**) a 2x1000 rpm, à temperatura

ambiente, durante 20 minutos. Em ambas foi extraída a fase aquosa com o auxílio de uma seringa e reservou-se num balão esmerilado de fundo redondo de 100 mL. A fase orgânica foi vertida de novo para o respetivo gobelé inicial e adicionaram-se mais 10 mL de metanol. As soluções foram de novo agitadas nas mesmas condições referidas acima e novamente centrifugadas, também nas mesmas condições já mencionadas. De novo, foram extraídas as fases aquosas para o mesmo balão, respetivamente. De seguida, cada fase aquosa presente no respetivo balão foi colocada no evaporador rotativo **Heidolph vv2000** a 35°C, à rotação entre 150-210 rpm, até à evaporação total do metanol. Após a evaporação, cada fase aquosa seca foi redissolvida em 2 mL de uma solução 60% metanol 40% água destilada. [20] As soluções resultantes foram vertidas cada uma para um vial diferente e, de seguida, enviadas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise de HPLC foi utilizada para caracterizar o perfil fenólico (de HT e Ty) como descrito na secção 2.2.2.

O procedimento anteriormente descrito foi também aplicado ao produto da concorrência **NaturOlive azeite**, o qual foi desenvolvido em duplicado.

Uma amostra de cada um dos 3 tipos de azeites conservados à temperatura ambiente foi ainda submetida a análise de cromatografia gasosa descrita na secção 2.2.3.

2.2.11. Secagem por atomização de concentrados de osmose inversa e de dessorvidos

A secagem do extracto foi realizada através de um processo designado por “secagem por atomização” (*Spray drying*). Este método foi aplicado ao RO 164, DSS1 e DSS2.

Inicialmente foi necessário preparar uma solução que consistiu na adição de um adjuvante de secagem ao respetivo extracto. Ao longo do trabalho o adjuvante usado para todos os extractos foi a maltodextrina **Bulk Powders** (MD).

Na **tabela 2.6** é possível encontrar a matriz utilizada em cada ensaio assim como a concentração de maltodextrina aplicada e os parâmetros necessários à operação do equipamento **Büchi Mini Spray dryer B-290**. Cada pó foi identificado com uma letra, consoante as condições aplicadas ao respetivo ensaio, sendo que foi também aplicado um número que designa a respectiva réplica. É importante referir que a produção de A a E e DSS foram realizadas fora do âmbito deste trabalho, encontrando-se destacadas com um asterisco na tabela 2.6. As condições referentes às produções designadas com as letras C e F são as mesmas.

Posto isto, é de referir que os pós derivados da matriz RO apresentam um teor de 9% de sólidos sendo que os que derivam do DSS apresentam 8%. Para ambas as matrizes o objectivo principal era a obtenção de um pó com 5% de hidroxitirosol sendo que todos eles foram, posteriormente, submetidos a análise HPLC (ver secção 2.2.2.) de forma a quantificar o composto fenólico.

Após a produção dos pós correspondentes aos ensaios F1 e K, estes foram analisados por GC como descrito na secção 2.2.3.

Tabela 2.6 – Representação da matriz e condições correspondentes de cada ensaio.

Designação	Matriz	Razão maltodextrina/RO (g/L)	Condições inseridas no equipamento			Temperatura à saída (°C)	Tempo de operação (h)
			Temperatura à entrada (°C)	Caudal de líquido (mL/min)	Azoto (L/h)		
A*	RO164	200	125	4,2	246	77	1
A1*		200	125	4,2	246	77	1
C*		150	125	3	246	79	1
C1*		150	125	3	246	77	6
C2*		150	125	3	246	76	5
C3*		150	125	3	246	78	6
C4*		150	125	3	246	77	6
D*		150	135	3	246	87	1
E*		150	145	3	246	93	2,5
F		150	125	3	246	80	2,5
F1		150	125	3	246	73	5
F2		150	125	3	246	75	4,5
F3		150	125	3	246	75	4,5
L		150	120	3	246	72	2
H		150	130	3	308	76	4,5
DSS*	DSS1	126	145	9	246	70	1
G		20	160	6	308	83	1
I		20	160	6	369	73	1
J		20	130	3	308	67	1
K	DSS2	28,3	125	3	246	77	2
M		28,3	120	6	246	69	2
N		28,3	130	3	308	78	5
N1		28,3	130	3	308	78	8

2.2.12. Determinação da temperatura de transição vítrea de micropartículas

A determinação da temperatura de transição vítrea foi aplicada aos pós, identificados com as letras H e J, produzidas na secção 2.2.10. e, para tal foi aplicado o método de análise por *DSC* - calorimetria diferencial de varrimento. O aparelho utilizado foi o **Setaram DSC 131** no qual uma amostra de pelo menos 10 mg de um dos ensaios foi submetida a um varrimento. O caudal aplicado foi, para ambas as amostras, 10 °C/ min e foi utilizada uma gama de temperaturas de -20 a 200 °C.

Para ambas as amostras foi aplicado um varrimento prévio com o mesmo caudal anteriormente mencionado mas com um intervalo de temperaturas entre os 0 e os +/- 100 °C para garantir a evaporação total da água antes da realização da análise.

2.2.13. Análise morfológica de partículas de pequena dimensão

De forma a analisar a morfologia das partículas formadas nos ensaios H, DSS, G e N da secção 2.2.10. e ao produto da concorrência **NaturOlive cápsulas** foi necessário recorrer ao uso do aparelho **Malvern Instruments Morphologi G3S** com o software **Malvern Morphologi 8.21**. Após inserir uma amostra de pó na coluna, procedeu-se à dispersão e análise da mesma. Recorreu-se às ampliações x5, x10, x20 e x50 para capturar uma imagem após a dispersão das nanopartículas. De seguida, deu-se início à contagem das mesmas até perfazer um total de +/- 30 000 partículas e onde a ampliação seleccionada foi a de x20 para todas as amostras excepto para o produto da concorrência, que foi de 50x.

Antes do procedimento anteriormente mencionado, cada amostra foi sujeita a uma secagem com azoto de forma a tornar a dispersão mais eficaz.

2.2.14. Determinação do teor de água de micropartículas

Às partículas produzidas (ver secção 2.2.10.) foi medido o seu teor em água através do método *Karl Fischer*. Para tal foram utilizados os seguintes aparelhos: **Metrohm 831 KF Coulometer** e **Metrohm 728 Stirrer**. O fluido *Hydranal-Coulomat AG* foi necessário numa quantidade inferior a 100 mL sendo que a quantidade de amostra inserida no equipamento foi de +/- 5 mg e foi analisada em triplicado.

2.2.15. Avaliação da influência da exposição ao ar em partículas obtidas de diferentes matrizes

De forma a testar a influência da exposição ao ar atmosférico das partículas obtidas na secção 2.2.10. segundo diferentes matrizes, foram necessários três vidros de relógio. Num foi inserida uma pequena quantidade (+/- 5 mg) do pó H, noutro foi inserida a mesma quantidade referente ao pó J. Por fim, no último vidro de relógio foi inserida maltodextrina na mesma quantidade que para os outros preparos. Cada preparação foi devidamente identificada e exposta ao ar atmosférico. O estado das partículas foi avaliado com o decorrer do tempo.

2.2.16. Determinação da densidade aparente de micropartículas de matrizes diferentes

A densidade aparente dos pós foi calculada adaptando o procedimento de *Fazaeli et al*^[36] com algumas alterações. Desta forma, foi inserida meia grama de pó do respectivo ensaio (H, L, DSS e J da secção 2.2.19.) numa proveta e, de seguida a mesma foi agitada no vórtex durante 1 min. Após esse tempo, foi medido o volume ocupado na proveta.

O valor da densidade foi obtido dividindo o peso inicial pelo volume ocupado das partículas (g/mL).

3. Resultados e discussão

Este capítulo destina-se à apresentação e discussão dos resultados obtidos e, para tal, é fundamental um enquadramento prévio de forma a facilitar a sua compreensão.

Inicialmente, no subcapítulo 3.1., encontrar-se-á uma relação alternativa face ao uso constante e dispendioso do método de cromatografia líquida de alta eficiência. Seguidamente, em 3.2., é apresentado o resultado do estudo de estabilidade realizado à matéria-prima, o RO, e posteriormente, nos subcapítulos seguintes, os resultados e discussão relativos aos estudos e análises dos produtos desenvolvidos a partir do extracto: azeites aditivados, méis solúveis em água (extractos aquosos) e pós para cápsulas de gelatina.

3.1. Quantificação de hidroxitirosol e de tirosol nos concentrados de osmose inversa

De forma a quantificar as amostras de concentrados de osmose inversa (ver secção 2.1.1.) em HT e Ty recorreu-se ao método HPLC descrito na secção 2.2.2. Para tal foi necessário elaborar uma recta de calibração para o hidroxitirosol e outra para o tirosol, sendo que estas rectas foram realizadas mais que uma vez.

A recta de calibração aplicada ao HT foi determinada recorrendo ao uso de diversas diluições da solução padrão de HT (mencionada na secção 2.1.5.). O passo seguinte consistiu na corrida de cada uma delas no equipamento, onde para cada uma se retirou a respectiva área do pico. Na tabela que se segue é possível observar um exemplo dos valores das áreas obtidas para cada diluição.

Tabela 3.1 – Área dos picos correspondente a cada concentração em HT.

Concentração de HT (mg/L)	Área (UA)
9,3	103
23,25	263
46,5	518
69,75	786
93	1045

No **anexo A1** encontra-se a recta de calibração elaborada com base nestes valores assim como a equação da linha de tendência.

Para a recta de calibração aplicada ao tirosol o procedimento foi o mesmo. Os valores das áreas correspondentes a cada diluição da solução padrão do Ty (secção 2.1.5.) encontram-se abaixo, sendo que a respectiva recta é apresentada no **anexo A2**.

Tabela 3.2 – Área dos picos correspondente a cada concentração em Ty.

Concentração de Ty (mg/L)	Área (UA)
0	0
10	75
20	145
40	289
60	428
80	563
100	712

Assim, obtidas as rectas de calibração, iniciou-se a corrida da respectiva amostra (previamente diluída) a quantificar nestas duas moléculas. Desta forma o aparelho elaborava o cromatograma correspondente a cada corrida. No **anexo A3** é possível ver um exemplo de um cromatograma de uma amostra diluída do concentrado de osmose inversa.

Os cálculos para a quantificação final dos concentrados de osmose inversa (RO) foram realizados tendo em conta o respectivo factor de diluição aplicado.

Seguidamente encontra-se um exemplo de análise a uma amostra de RO 164 onde, de uma forma muito resumida, se podem observar os diversos parâmetros para a quantificação de hidroxitirosol (**tabela 3.3**) e tirosol (**tabela 3.4**).

Tabela 3.3 – Parâmetros utilizados na determinação da concentração de hidroxitirosol de uma amostra de concentrado de osmose inversa.

Amostra	Área (UA)	Concentração (mg/L)	Fator de diluição (FD)	Concentração (mg/L)
RO 164	657	58,492	200	11698

Tabela 3.4 - Parâmetros utilizados na determinação da concentração de tirosol de uma amostra de concentrado de osmose inversa.

Amostra	Área (UA)	Concentração (mg/L)	Fator de diluição (FD)	Concentração (mg/L)
RO 164	68	8,975	200	1795

3.1.1. Estimativa rápida das concentrações de hidroxitirosol e tirosol nos concentrados de osmose inversa através do método de análise de fenóis totais

As análises de cromatografia líquida proporcionam resultados precisos de concentração de HT e Ty mas requerem aparelhagem muito sofisticada e cara, com disponibilidade limitada para centros de produção, como lagares de azeite. Os métodos colorimétricos de determinação de concentrações totais de fenóis, tal como o método de *Folin-Ciocalteu* descrito na secção 2.2.5, são fáceis de aplicar em ambiente fabril, requerendo condições laboratoriais mínimas. De forma a conseguir uma correlação de fácil aplicabilidade que permitisse saber a composição em HT e Ty dos concentrados de osmose inversa (RO), recorreu-se àquele método. Este iria permitir o conhecimento da concentração destas moléculas nos concentrados sabendo apenas a concentração de fenóis totais (obtida pelo método em 2.2.1.) sem ser necessário recorrer ao procedimento descrito em 3.1.

Assim, no gráfico abaixo é possível observar a correlação obtida entre a concentração de HT e a concentração de fenóis totais desenvolvida no âmbito da tese de Marta Marques^[33].

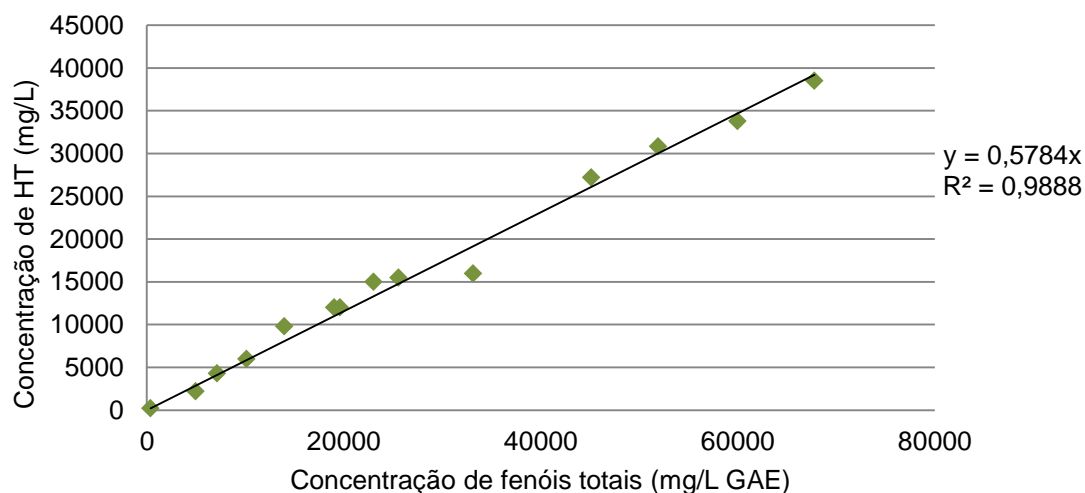


Figura 3.1 - Relação entre concentração de HT e concentração de fenóis totais.

Pela análise à equação da **figura 3.1** é possível perceber que aproximadamente 58% da concentração total de fenóis presentes nos concentrados de osmose inversa dizem respeito ao hidroxitirosol.

Na figura seguinte apresenta-se a correlação entre a concentração de fenóis totais e a soma das concentrações de hidroxitirosol e tirosol que mantém a linearidade da correlação acima apresentada.

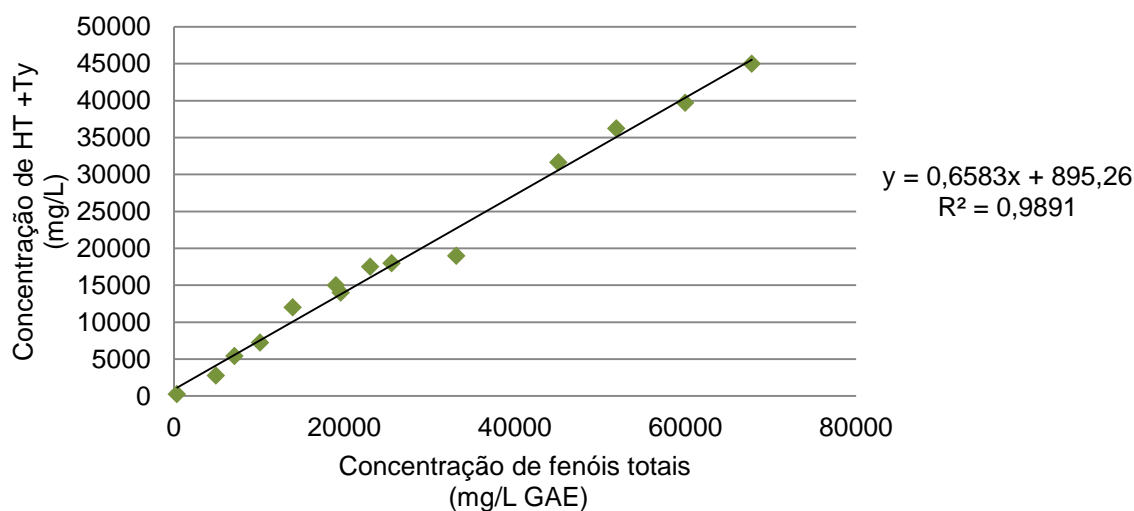


Figura 3.2 - Relação entre concentração de HT+Ty e concentração de fenóis totais.

Um exemplo de aplicabilidade das correlações acima descritas é o da determinação das concentrações de HT e Ty do concentrado de osmose inversa RO 164, em que o método *Folin-Ciocalteu* produziu os resultados 12 000 mg/ L de hidroxitirosol e 13 500 mg/ L de hidroxitirosol+tirosol, sendo que a análise cromatográfica registou os mesmos 12 000 mg/ L e 13 500 mg/ L, respectivamente. Pode-se então concluir que, de facto, esta relação é aplicável.

3.2. Análise da estabilidade do concentrado de osmose inversa

Por forma a analisar a estabilidade em HT e Ty do RO 164 ao longo do tempo, foi traçado um perfil da presença destes compostos recorrendo ao método descrito em 2.2.6. É importante referir que este estudo foi continuado sendo que o extracto se encontrava armazenado em bidões de plástico a 5°C. O ponto zero diz respeito à data de entrega do extracto à FCT (14-07-2016). Posto isto, o perfil obtido foi o observado na **figura 3.3**, com uma duração aproximada de 13 meses (ver em a anexos **tabela C1**).

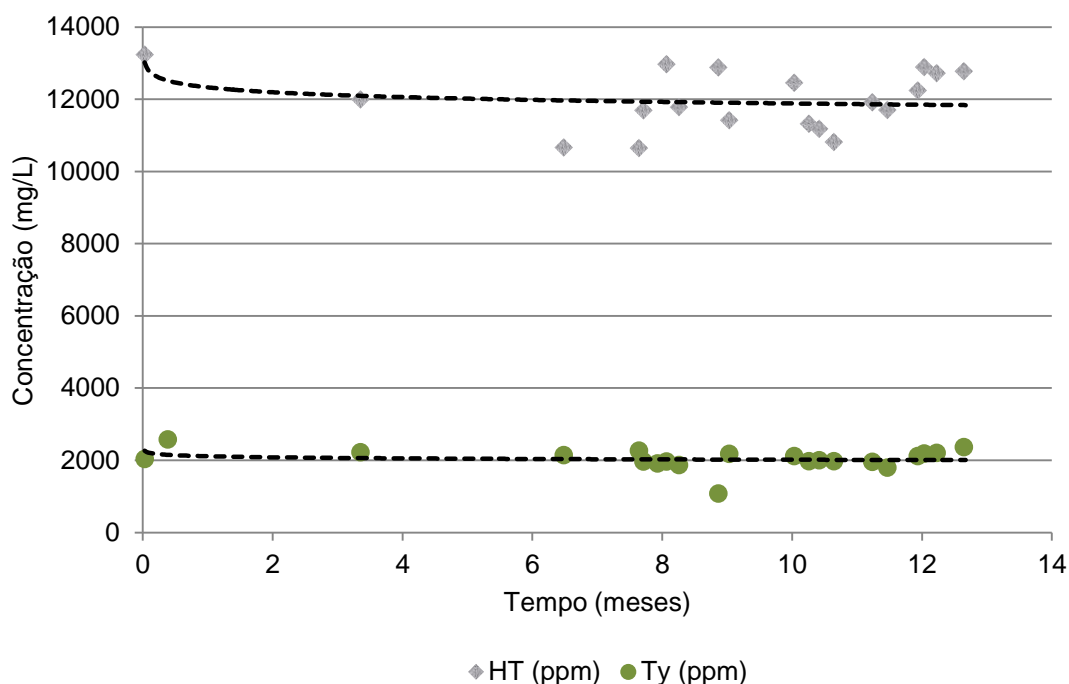


Figura 3.3 – Concentração respectiva de HT e Ty no RO 164 ao longo do tempo.

Da análise ao gráfico consegue-se perceber que, contabilizando possíveis erros de análise (ver oscilação dos pontos), o concentrado apresenta grande estabilidade nas moléculas hidroxitirosol e tirosol para o tempo delineado.

De referir ainda que, durante este estudo (mês 7 no gráfico), houve uma mudança nas condições de armazenamento do extracto, tendo passado de uma temperatura de 5°C à temperatura ambiente (+/- 25°C). Este facto permite reforçar o facto já mencionado no parágrafo anterior uma vez que os compostos fenólicos têm tendência a deteriorar-se mais depressa a temperaturas mais elevadas.^[37]

3.3. Estudo da conservação do concentrado de osmose inversa

Tanto a temperatura como luz favorecem a formação de espécies reactivas de oxigénio que por sua vez diminuem a presença de compostos antioxidantes. Assim, o estudo da conservação do concentrado teve como objectivo a análise da influência da luz e da temperatura na preparação de um mel solúvel em água para o tempo estipulado. Para tal procedeu-se à evaporação do RO 164 dos 100 mL até ao estado mel (cinco vezes), sendo que cada produto final foi submetido a diferentes condições conforme descrito na secção 2.2.7.

Nesta secção é ainda indicado que um dos evaporados foi analisado por HPLC de forma a saber a quantidade de HT que havia inicialmente.

O concentrado evaporado apresentava 152 g/L em hidroxitirosol no início do estudo.

Após 4 meses, os concentrados evaporados apresentaram os seguintes valores de HT apresentados na **tabela 3.5**. Foi também incluído no estudo um concentrado comercial, *AquaOlive*, cuja sua concentração inicial era 121 g/L.

Tabela 3.5 – Representação dos valores da concentração de hidroxitirosol no RO 164 evaporado para diferentes condições após 4 meses.

Amostra	Temperatura (°C)	Presença de Luz	[HT] (g/L)
Mel de RO164	Ambiente (+/- 25°C)	Sim	159
	Ambiente (+/- 25°C)	Não	165
	5	Não	161
	40	Não	156
<i>AquaOlive</i>	Ambiente (+/- 25°C)	Não	125

Segundo o método aplicado não houve alteração significativa nos valores da concentração de HT isto porque o aumento observado, para todos, é inferior a 10%. Assim, é importante concluir que, num espaço de 4 meses sob as condições acima definidas, o RO evaporado se apresentou estável. Ainda pela análise da tabela é possível ver que o *AquaOlive* também se apresentou estável durante aproximadamente 2 meses.

Relativamente ao aspecto físico das amostras é importante mencionar que, no início do estudo, o produto da concorrência apresentava uma coloração acastanhada e os concentrados da *Zeyton* apresentavam uma cor negra como se pode observar na imagem que se segue.



Figura 3.4 – Amostras do mel de RO 164 e *AquaOlive* no início do estudo da conservação.

Foi tirada uma foto por semana para o caso de se notar alguma alteração na coloração. Contudo nenhuma diferença foi notada visivelmente, sendo que na figura abaixo encontra-se a imagem correspondente ao 4º mês (último mês do estudo).



Figura 3.5 – Amostras do mel de RO 164 e *AquaOlive* no fim do estudo da conservação.

Apesar do aspecto físico não apresentar nenhuma alteração, decidiu-se submeter o concentrado conservado na estufa a análise de cromatografia gasosa (GC).

Da análise por GC (secção 2.2.3.) foram determinadas as áreas dos picos correspondentes aos voláteis responsáveis pelo cheiro avinagrado, ranço, alcatrão e avinhado que não se pretendia neste concentrado evaporado de RO (ver gráfico abaixo).

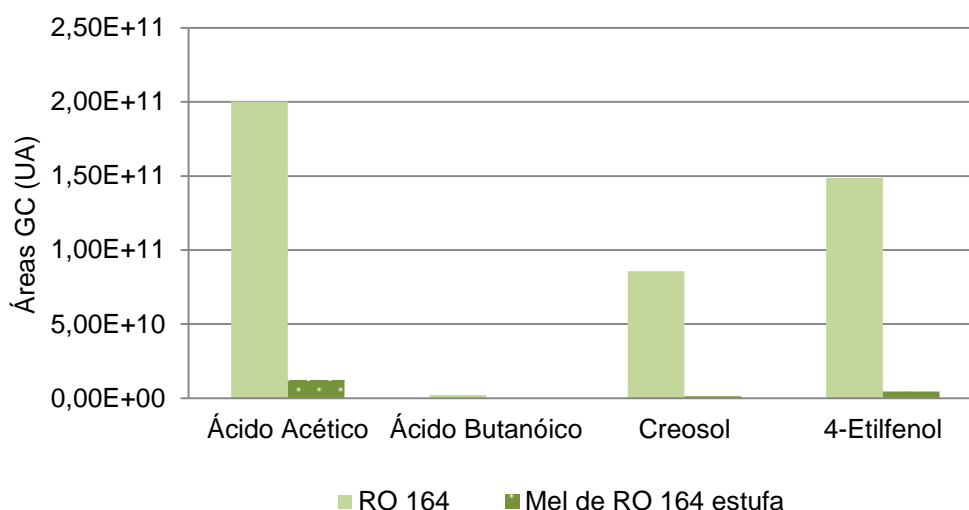


Figura 3.6 – Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 164 à temperatura ambiente e no mel de RO 164 conservado na estufa.

O que se observa no gráfico são as áreas dos picos dos voláteis: ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol, obtidas por análise de cromatografia gasosa referentes ao extracto RO 164 conservado à temperatura ambiente e ao extracto RO 164 evaporado conservado na estufa. É importante referir que nesta comparação não foi tido em conta o factor de diluição. Desta forma é possível perceber que o concentrado na estufa apresentou muito menos voláteis ao fim de 4 meses como seria de esperar. Esta evidência pode ser uma boa oportunidade de tratamento na medida em que se eliminam estes voláteis não desejáveis contudo a concentração de hidroxitirosol acaba por ser afectada.

No decorrer do estudo destas análises de GC foi ainda comparado o extrato *AquaOlive* com o RO 164 evaporado para as mesmas condições (à temperatura ambiente e protegido da luz) incluindo o RO 164 evaporado conservado na estufa. Assim, na **figura 3.7** encontra-se o gráfico que mostra a diferença entre cada produto.

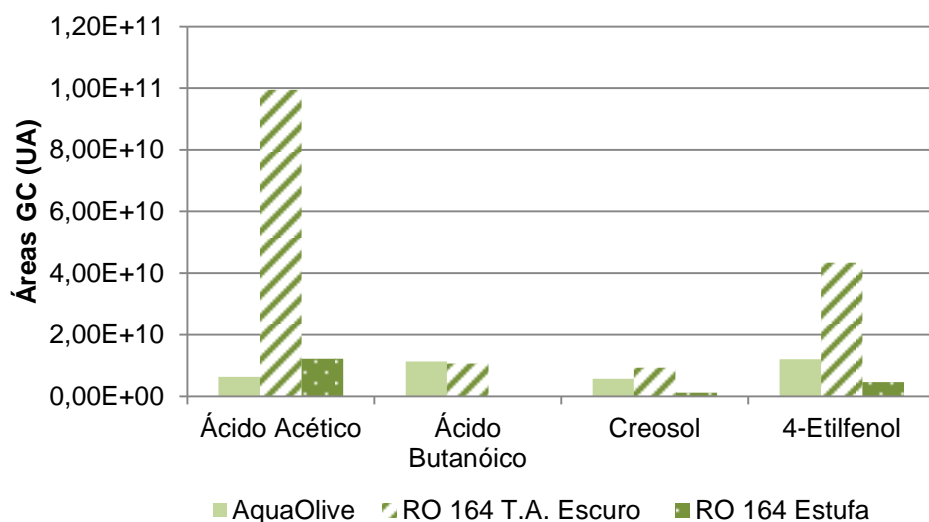


Figura 3.7 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no *AquaOlive*, no RO 164 evaporado conservado à temperatura ambiente e protegido da luz e no RO 164 evaporado conservado na estufa e protegido da luz.

Do gráfico acima se percebe que o *AquaOlive* apresenta uma quantidade considerada inexistente destes voláteis em comparação com o RO 164 conservado na estufa ou à temperatura ambiente. Outra observação importante é a eliminação da maior parte do ácido acético e do 4-etilfenol quando o evaporado é conservado na estufa, o que vem sublinhar o facto anteriormente evidenciado de que a 40 °C para um período de 4 meses se consegue minimizar a concentração destes voláteis sem afectar a quantidade de hidroxitirosol.

3.4. Preparação de extratos aquosos e redução do odor avinagrado em concentrados de osmose inversa

De modo a obter um concentrado rico em hidroxitirosol eliminando o odor avinagrado (ácido acético) do mesmo, foi evaporado o RO 164 e o RO 161 até ao estado de mel, sendo que a cada evaporado obtido foram adicionados 40 g de etanol e de glicerol, como descrito na secção 2.2.8. e 2.2.9., respectivamente.

Desta forma, cada concentrado preparado anteriormente foi submetido a análise de HPLC para determinar a quantidade de hidroxitirosol (HT).

No gráfico da figura que se segue é possível observar a diferença da composição em HT no preparado RO 161 com glicerol, RO 161 com etanol, RO 164 com glicerol e RO 164 com etanol, respectivamente.

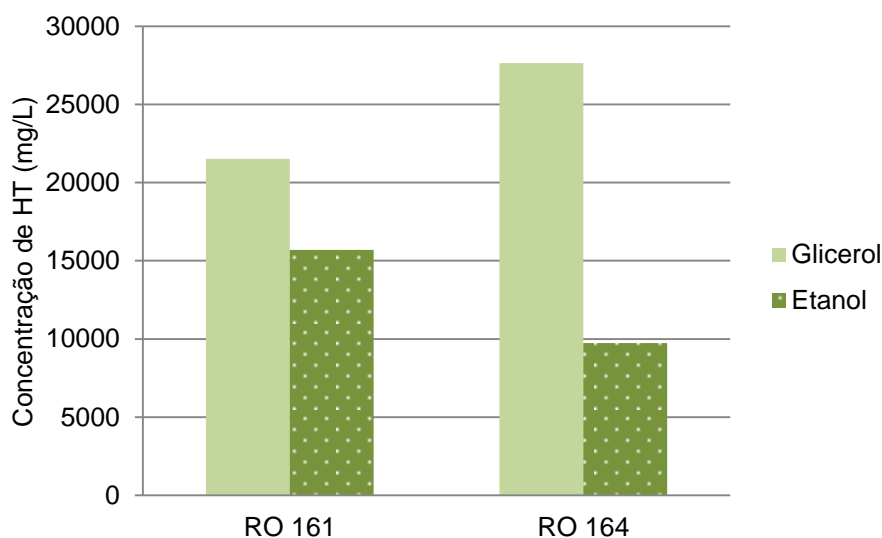


Figura 3.8 – Concentração de HT para RO 161 e RO 164 cada um com com glicerol e com etanol, respectivamente.

Dos resultados apresentados no gráfico é possível concluir que em ambos os concentrados com etanol a quantidade de HT é muito menor face aos concentrados com glicerol, sendo que no RO 164 esta diferença é muito mais acentuada. É importante referir que antes da evaporação cada RO apresenta um valor medido de HT de 10 000 mg/L e 12 000 mg/L no RO 161 e 164, respectivamente, pelo que não foi possível obter um concentrado evaporado com uma concentração de HT superior no RO 164 com etanol.

No decorrer da experiência observou-se ainda uma possível justificação quanto à diferença da presença de HT observada no gráfico para concentrados com etanol e com glicerol. O facto é que nas amostras com etanol se observou uma deposição do que pareciam ser sais e hidratos de carbono no fundo de cada vial (ver **figura 3.9**).



Figura 3.9 – Amostras de RO 161 e RO 164 com glicerol e com etanol, respectivamente (da esquerda para a direita).

Apesar de não haver nenhuma certeza, coloca-se a possibilidade de sais e açúcares que poderão ter precipitado e arrastado consigo moléculas de hidroxitirosol que acabam por ficar depositadas no fundo dos vials, não sendo contabilizadas nas análises de HPLC.

Ainda no decorrer deste estudo a empresa *Zeyton* forneceu uma amostra de dessorvido, intitulado DSS1, a qual derivou de um processo de adsorção/dessorção aplicado ao concentrado RO (ver secção 2.1.2.). Esta amostra apresentava 1 100 mg/L de hidroxitirosol e o objectivo era formular um concentrado com a adição de glicerol, visto que desta forma era

possível obter um concentrado homogêneo sem precipitação de HT. Assim, o DSS1 foi evaporado e, de seguida foi adicionado glicerol (ver **figura 3.10**). Após ser analisado, este apresentou uma concentração de 3 211 mg/L de HT.



Figura 3.10 – Amostra de DSS1 evaporado com adição de glicerol.

Como foi dito anteriormente, um dos objectivos da elaboração dos concentrados com glicerol era reduzir o odor avinagrado dos mesmos pelo que estes foram sujeitos a análises GC onde se obtiveram as áreas dos picos dos principais compostos voláteis a eliminar. Nas figuras que se seguem (3.11 e 3.12) é possível ver os gráficos com as respectivas áreas GC e percentagens de eliminação do RO 161 com etanol e glicerol, por esta ordem.

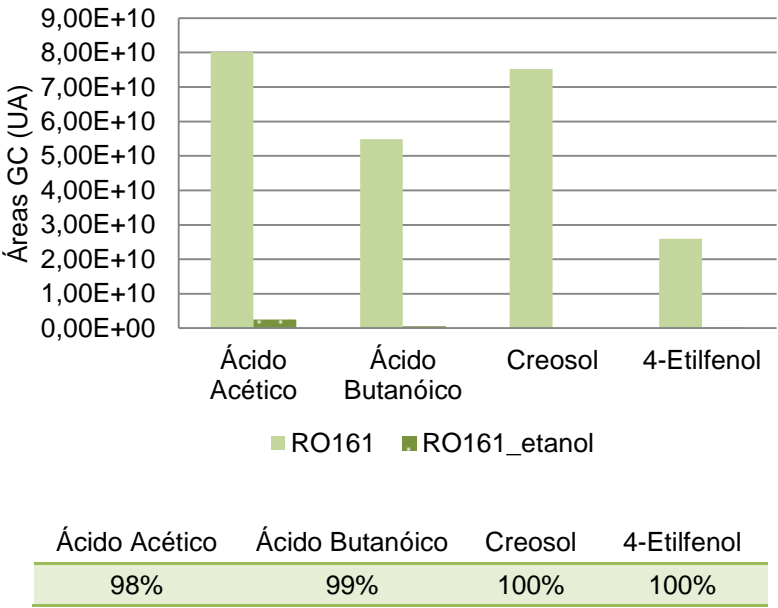
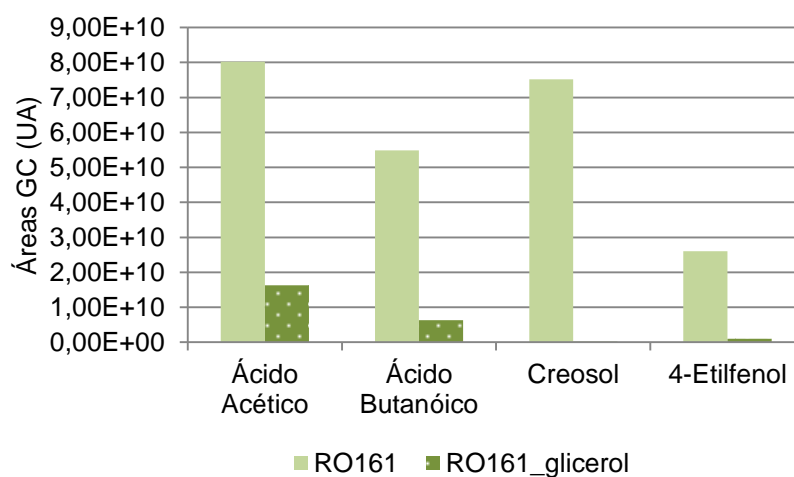


Figura 3.11 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 161 com etanol e respectiva percentagem de eliminação.

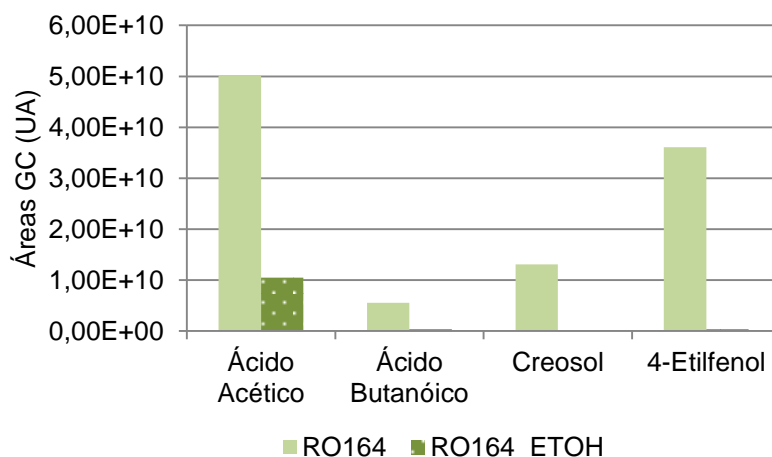


Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
80%	88%	100%	96%

Figura 3.12 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 161 com glicerol e respectiva percentagem de eliminação.

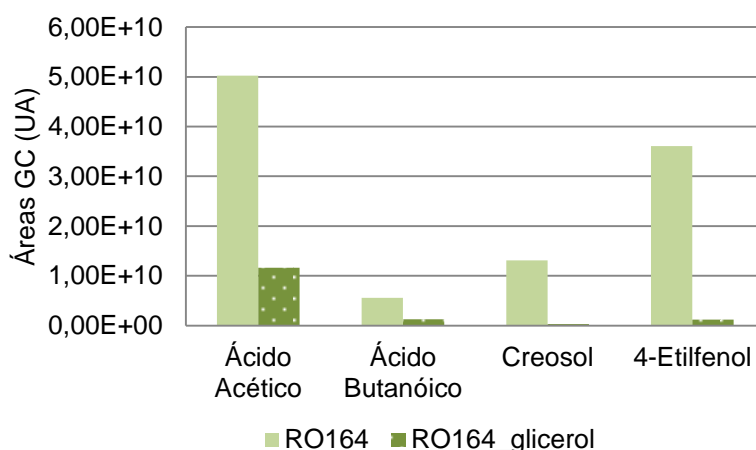
Desta forma é possível concluir que, apesar de se obter uma maior concentração de hidroxitirosol adicionando glicerol, com etanol consegue-se, por outro lado, uma melhor percentagem de eliminação dos compostos voláteis. No entanto, é importante salientar que em ambos os concentrados se conseguiu eliminar por completo o creosol, responsável pelo odor a alcatrão.

Da mesma forma, foram comparadas as áreas dos picos obtidos por GC para o RO 164 com etanol e com glicerol. Nos gráficos das figuras que se seguem encontram-se as áreas e respectivas tabelas com percentagens de eliminação.



Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
90%	96%	99%	99%

Figura 3.13 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 164 com etanol e respectiva percentagem de eliminação.



Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
77%	77%	98%	97%

Figura 3.14 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no RO 164 com glicerol e respectiva percentagem de eliminação.

De modo semelhante ao RO 161, no concentrado RO 164 obteve-se uma percentagem de eliminação dos voláteis superior com a adição de etanol que com glicerol. Note-se que o extrato RO 164 apresenta, já de início, uma presença destes compostos bastante inferior face ao RO 161.

Quanto ao dessorvido, DSS1, foi feita a mesma análise sendo que os resultados se encontram na **figura 3.15**.

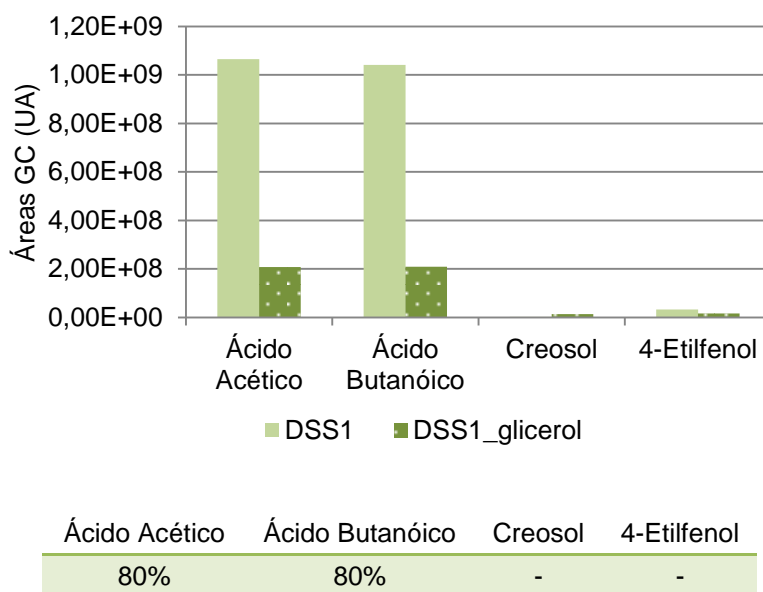


Figura 3.15 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes no DSS1 com glicerol e respectiva percentagem de eliminação.

Relativamente às percentagens de eliminação destes voláteis no DSS1 é necessário ter em conta que o dessorvido apresenta inicialmente uma quantidade bastante inferior nestes compostos face ao RO 164 (comparar as escalas). Assim, a quantidade de creosol e 4-Etilfenol presente é considerada inexistente. Desta forma, o DSS1 com glicerol proporcionou uma redução de 80% para cada um dos ácidos, acético e butanóico.

3.5. Estudo da conservação de azeites aditivados

Neste trabalho foi dada continuação ao estudo da conservação de azeites aditivados iniciado pela empresa *Zeyton*. Assim, o objectivo desta análise era avaliar a estabilidade em hidroxitirosol e tirosol pelo período de um ano de dois tipos de azeite: aditivados sob solução aquosa e aditivados com adição de glicerol. Desta forma foram atribuídos códigos a cada azeite, sendo que o aditivado sob solução aquosa foi definido como AZHT16114 e o aditivado com glicerol como AZHT16115, tendo estes, sido submetidos a análise de HPLC mensalmente conforme descrito na secção 2.2.10.

É importante mencionar que para o estudo se consideraram as massas moleculares do HT (154 g/mol) e do Ty (138 g/mol) pelo que, ao longo de todo o trabalho, as concentrações se encontram expressas em micromole.

Como é dito na secção 2.1.3. os azeites foram testados a diferentes temperaturas. Assim, nos gráficos das figuras que se seguem é possível encontrar o resultado do estudo efectuado para cada condição, TA-temperatura ambiente, E-estufa (40°C) e F-frio (5°C).

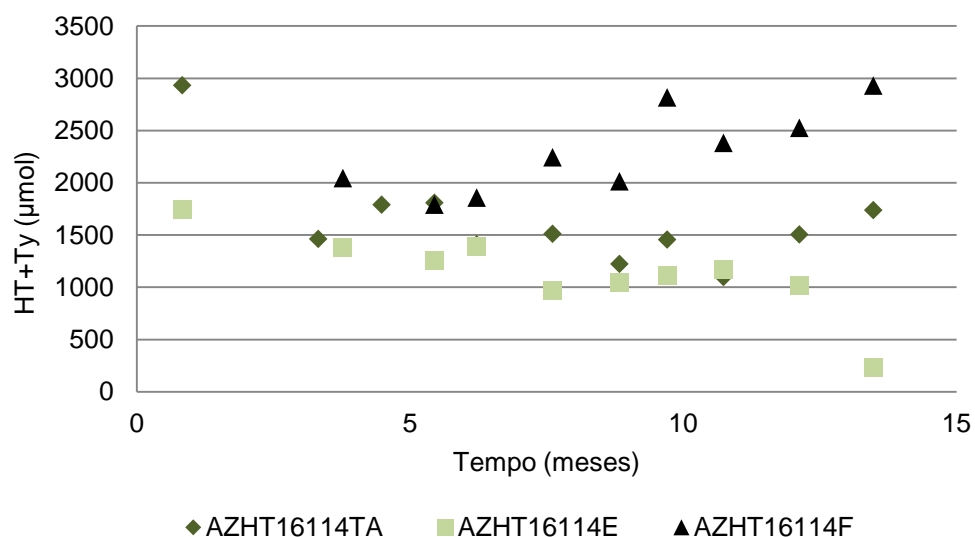


Figura 3.16 – Concentração de HT + Ty ao longo de um ano para o azeite aditivado sob solução aquosa a diferentes condições.

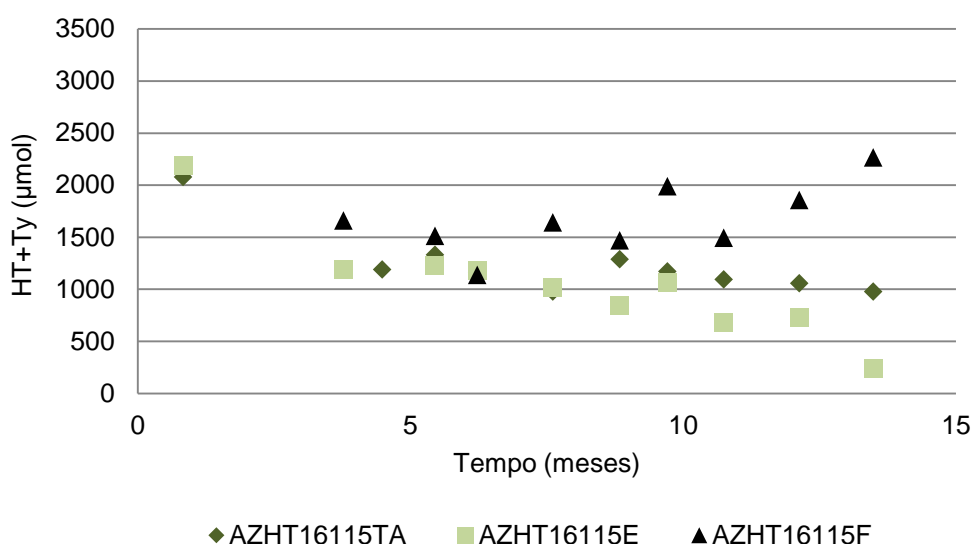


Figura 3.17 - Concentração de HT + Ty ao longo de um ano para o azeite aditivado com glicerol a diferentes condições.

A primeira observação que se pode retirar da leitura dos gráficos é que o azeite aditivado sob solução aquosa apresenta maior concentração de HT e Ty, o que leva a crer que ao azeite quando é adicionado glicerol estes compostos têm tendência a precipitar. Outra conclusão é que no frio os compostos fenólicos apresentam maior estabilidade como seria de esperar. Ainda pela observação do gráfico se entende que para os azeites conservados à temperatura ambiente estes apresentaram-se estáveis para o período delineado.

3.5.1. Comparação entre azeites *Zeyton* e *NaturOlive azeite*

No final do estudo dos azeites da empresa *Zeyton* surgiu a possibilidade da determinação da concentração de Hidroxitirosol e Tirosol presente num azeite comercial intitulado de *NaturOlive*. De referir que em relação a este azeite nada se sabia acerca da sua data de produção.

Assim, foi construído um gráfico (ver **figura 3.18**) no qual é possível encontrar a comparação das concentrações da HT+Ty nos diferentes tipos de azeite conservados à temperatura ambiente.

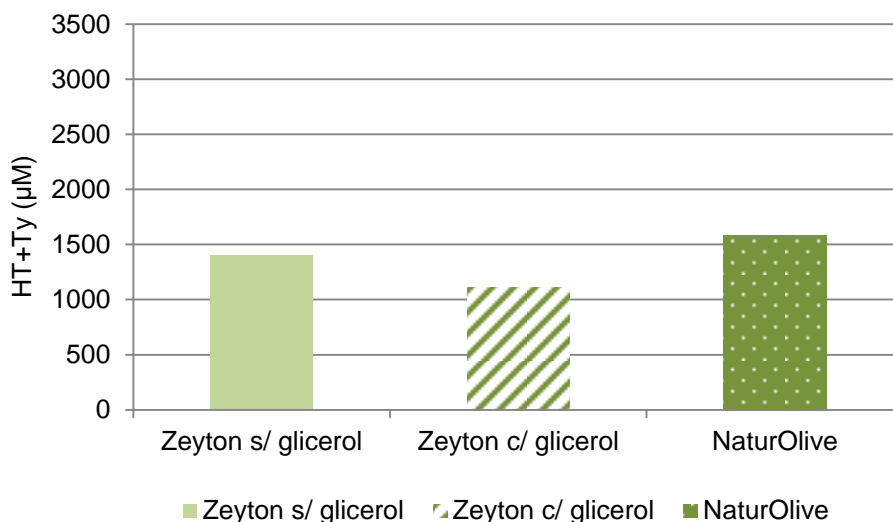


Figura 3.18 - Concentração de HT+Ty nos respectivos azeites *Zeyton* sem e com glicerol à temperatura ambiente e enquadramento do azeite *NaturOlive*.

Da análise ao gráfico é possível perceber que os 3 tipos de azeite apresentam concentrações bastante próximas não havendo diferenças significativas.

Cada azeite foi ainda submetido a análise de cromatografia gasosa de forma a quantificar o teor em ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol. No gráfico abaixo encontram-se os resultados obtidos.

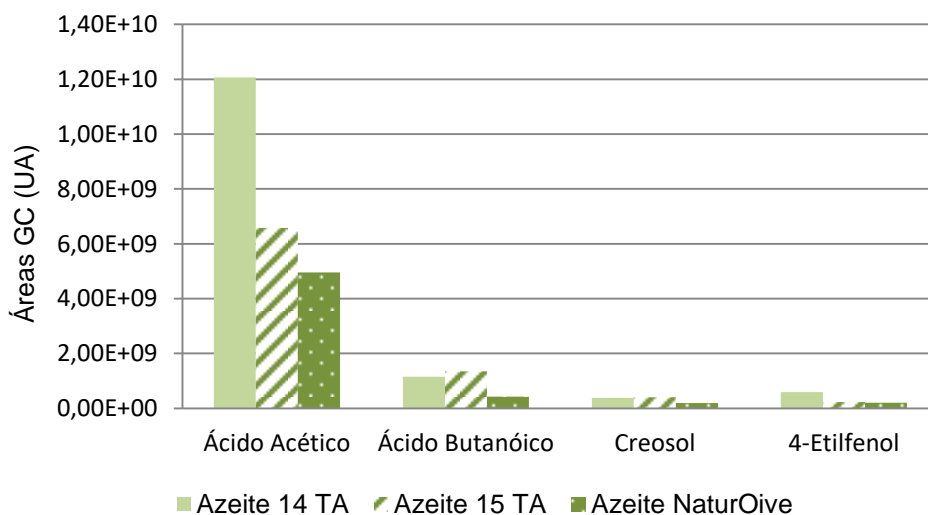


Figura 3.19 - Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol presentes em cada azeite conservado à temperatura ambiente.

Da leitura da **figura 3.19** se conclui que qualquer um dos azeites apresenta uma quantidade considerada inexistente dos voláteis analisados, com exceção do ácido acético. Contudo, o azeite *NaturOlive* e o azeite *Zeyton* com glicerol apresentam uma quantidade de acético relativamente próxima.

3.6. Estudo das micropartículas obtidas por secagem dos concentrados de osmose inversa

Com o objectivo de produzir um suplemento alimentar capaz de incorporar o extracto rico em hidroxitirosol recorreu-se à técnica de secagem por atomização (*spray drying*) apresentada na secção 1.5.2. A formação de micropartículas através deste método começou por ser aplicada ao concentrado de osmose inversa, mais concretamente ao RO 164, ao qual foi aplicado o procedimento e as condições descritas na secção 2.2.11. de forma a obter as partículas designadas pela letra F.

Estas partículas, da F à F3, em conjunto com outras produzidas fora do âmbito deste trabalho (partículas da A a E na tabela 2.6.), foram analisadas quanto à sua composição em hidroxitirosol, conforme o método descrito em 2.2.2., e quanto ao seu teor em humidade (ver secção 2.2.14).

No gráfico que a seguir se apresenta encontram-se os resultados das percentagens de HT e H₂O das amostras de cada pó.

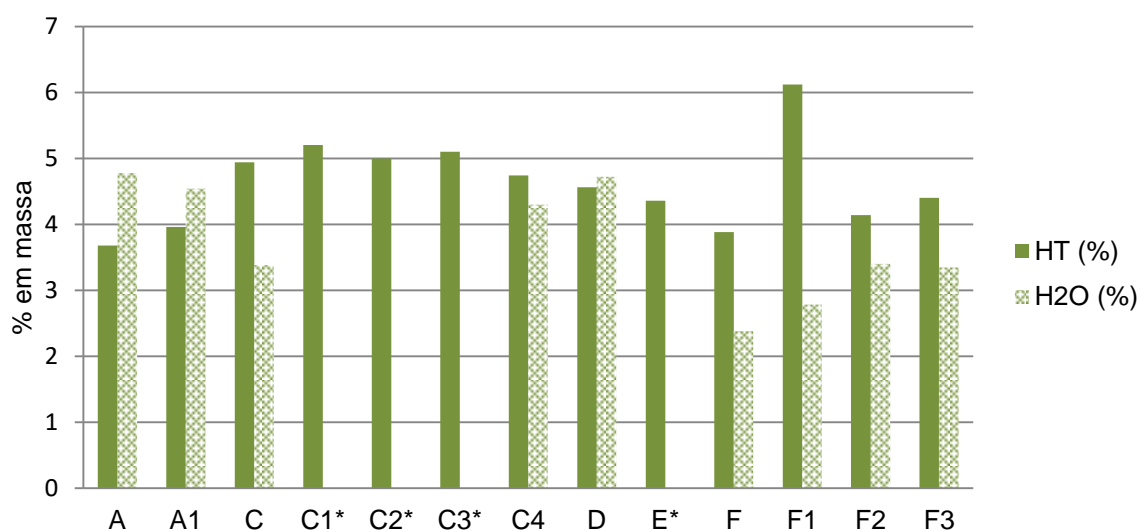


Figura 3.20 – Representação gráfica da composição de cada pó em HT e H₂O (cada letra corresponde a diferentes condições e/ ou tipo de matriz utilizada e cada número corresponde à sua réplica).

* pós com teores de humidade não conseguidos e valores de HT fornecidos pela empresa Zeyton.

Daqui se pode afirmar que, considerando possíveis erros de análise, se consegue obter um pó com cerca de 5% de teor em hidroxitirosol como era pretendido, apresentando ainda, aproximadamente, 4% de humidade na sua composição. A variação das condições de operação pouco influenciaram no conteúdo em fenol HT, ainda que seja uma conclusão meramente restrita pela análise ao gráfico da **figura 3.20**.

Através da construção de um gráfico de reprodutibilidade, apresentado imediatamente abaixo, é possível notar uma alteração dos pós intitulados de C para os F os quais foram sujeitos às mesmas condições. Assim, para as partículas F houve uma maior oscilação dos valores de HT o que poderá indicar a presença de factores que não estão a ser contabilizados.

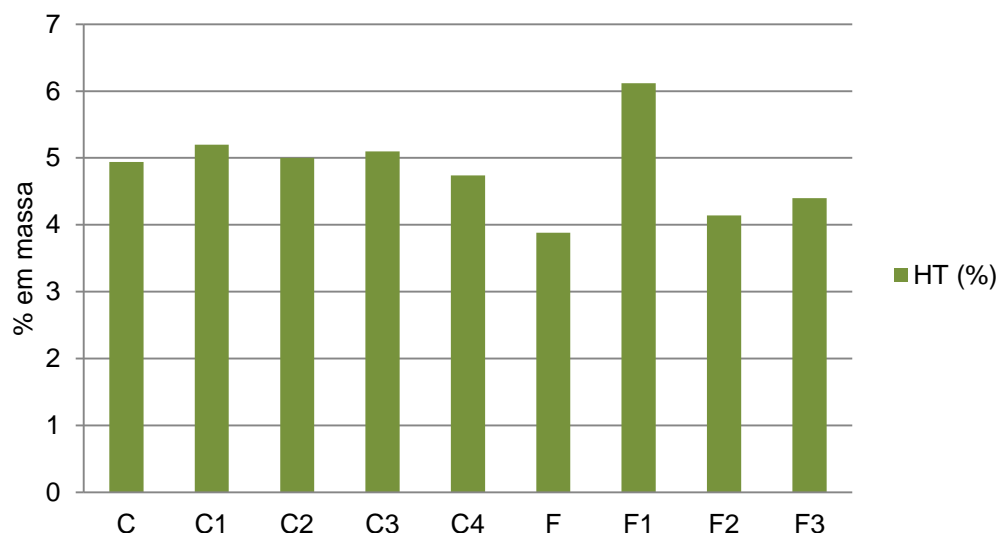


Figura 3.21 – Gráfico de reprodutibilidade dos pós C e F obtidos sob as mesmas condições.

É importante referir que as partículas que já haviam sido produzidas (A-E) apresentavam alguns sinais de degradação que se acentuaram com o tempo e, algumas até, apresentavam-se sob a forma de um aglomerado sólido com aspecto meloso que impossibilitou a sua análise relativa à composição em água (valores com asterisco no gráfico da **figura 3.20**). Aliás, no decorrer destas análises, surgiu ainda uma tentativa de estudo à estabilidade em HT (%) ao longo do tempo do pó F1 e, a verdade é que, num espaço de 2 meses, este foi apresentando o aspecto que se pode observar na figura a abaixo.



Figura 3.22 - Sequência de imagens de degradação do pó F1 (da esquerda para a direita).

O resultado desse estudo traduz-se no gráfico que a seguir se apresenta, no qual, da 3ª para a 4ª medição o pó já se apresentava sob a forma de um aglomerado bastante pastoso. Em anexo, **tabela H1**, encontram-se os valores necessários à construção do gráfico.

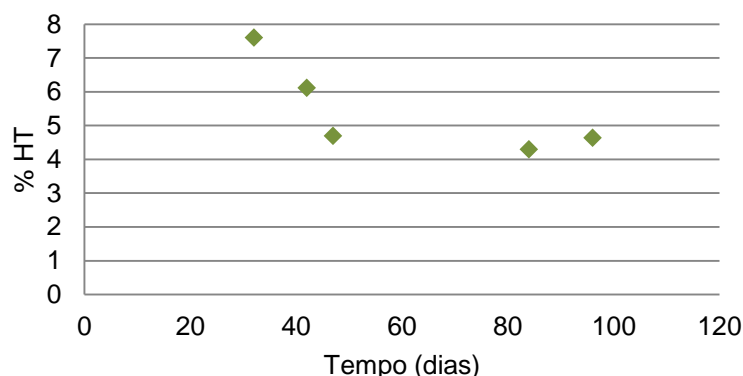


Figura 3.23 – Representação gráfica do teor de HT (em %) ao longo do tempo na tentativa de estudo da estabilidade do pó F1.

O facto é que, apesar de se conseguir um pó com um teor de HT desejado, não era possível que este fosse fisicamente estável.

Verificou-se na mesma altura que um pó, intitulado de DSS e produzido fora do âmbito deste trabalho, se apresentava ainda solto, de aspecto semelhante ao aparentado no dia da sua produção. Este apresentava aproximadamente mais 2 meses que os pós de A a E e mais 4 meses que o F1 contudo a quantidade de HT também diferia apresentando 1% da sua concentração.

Na figura que se segue é possível ver a diferença entre os pós DSS e F1, cada um com respectivamente 139 e 46 dias. Onde, de uma forma geral todos os pós anteriormente analisados apresentavam uma coloração mais escura que a do DSS.



Figura 3.24 – Aspecto físico dos pós DSS e F1 (respectivamente, da esquerda para a direita).

Numa primeira linha de pensamento fez-se crer que talvez a estabilidade dos pós fosse afectada pela existência de uma temperatura de transição vítrea (T_g) que não estava a ser considerada na produção das partículas derivadas do extracto de RO. Contudo não era possível averiguar a veracidade de tal afirmação uma vez que já não existiam partículas derivadas deste extrato. Esta razão conduziu à produção das restantes partículas da **tabela 2.6.** (ver secção 2.2.11. ensaios de G a N, H e L) para posteriores análises onde, à excepção de L e H, todos tiveram origem em matrizes intituladas de dessorvido, DSS1 e DSS2, fornecidas pela empresa *Zeyton*.

Assim, na tabela que se segue encontram-se as condições e os resultados das análises de HT (obtidos por HPLC) e das medições de humidade (método *Karl Fischer*) feitas às novas partículas e ao DSS.

Tabela 3.6 – Teores de hidroxitirosol e de humidade de cada pó sob diferentes condições.

Condições de operação								Desig
Matriz	Razão Maltodextrina /RO (g/L)	Temp. à entrada (°C)	Temp. à saída (°C)	Caudal (mL/min)	Azoto (L/h)	Ht (%)	H ₂ O (%)	
RO	150	120	72	3	246	5	4	L
		130	76		308	4	4	H
DSS	126	145	70	9	246	1	6	DSS
	20	160	73-83	6	308	4	4	G
					369	5	4	I
	28,3	130	67	3	308	4	4	J
		125	77		246	7	s/ análise	K
		120	69	6		8	3	M
		130	78	3	308	4	3	N
						s/ análise	s/ análise	N1

Como se pode ver pela **tabela 3.6**, os parâmetros das condições de operação foram alteradas, isto porque surgiu uma tentativa de cruzamento de resultados entre os pós de uma e de outra matriz, sobretudo para se tentar comparar a influência na concentração de HT para as mesmas condições. Contudo, este método não apresentou dados suficientes para que tal comparação fosse possível. O facto é que quando se aplicou, ao RO 164, uma temperatura de entrada superior a 130°C para um nível de azoto igual ou superior a 25 mm não havia produção, isto é, nestas condições o equipamento não era capaz de secar o extracto.

Na imagem que a seguir se apresenta é possível observar o aspecto não desejado do produto no ciclone do *spraydryer* em que nesta peça do equipamento o extracto já deveria apresentar-se sob a forma de partículas completamente secas (pó).

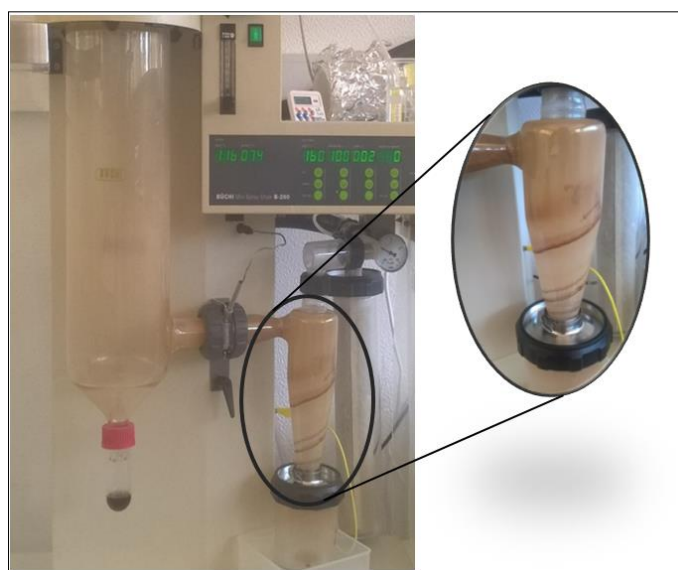


Figura 3.25 – Aspecto não desejado da produção de partículas derivadas do concentrado de RO para temperaturas superiores a 130°C a um nível de azoto de 25 mm.

No decorrer destes ensaios foi ainda calculada a percentagem de perdas ocorridas durante o processo de secagem por pulverização para um pó proveniente de uma matriz de RO e outro de uma matriz de dessorvido. Assim sendo, estes cálculos foram realizados para partículas produzidas exactamente nas mesmas condições, inclusive tempos de operação. A cada ensaio foi atribuído um código consoante a letra correspondente, seguido da matriz a que lhe deu origem e da percentagem de HT esperado. Posto isto, na figura abaixo é possível encontrar o valor das perdas (em %) presente em cada peça do equipamento para os ensaios H_RO_HT5 e N_DSS_HT5.

Equipamento	H_RO_HT5	N_DSS_HT5
	%	
(1) Câmara de secagem	78,3	66,2
(2) Frasco de separação	0,7	0,0
(3) Ligação T _{saída}	14,2	7,1
(4) Cotovelo de vidro	0,1	0,6
(5) Copo de recolha	0,1	1,5
(6) Tubo de filtragem	0,2	2,1
(7) Ciclone	6,5	22,6
(8) Nozzle	0	0
(9) 2 O-rings	0	0
(10) Filtro	0	0



Figura 3.26 – Representação esquemática das perdas ocorridas durante o processamento de um extracto proveniente de um RO e de um DSS.

Na produção dos dois pós anteriormente mencionados obtiveram-se perdas totais no valor de 82% e 17% para H e N, respectivamente. Pela análise à tabela da figura 3.27 é possível notar que na produção do pó derivado da matriz RO a maior parte das perdas se encontram localizadas logo nas peças iniciais do processo i.e. na câmara de secagem e na Ligação T_{saída} em comparação com o pó derivado de um dessorvido que, apesar de a maior percentagem residir também na câmara de secagem, a restante parte das perdas se concentram essencialmente nas peças finais do processo. Estes factos permitiram concluir que no extracto RO a secagem não é tão eficiente até mesmo por se obter resíduo no frasco de separação.

Esta análise levou a crer que a dificuldade na secagem do RO residia na quantidade de hidratos de carbono presente no extracto, os quais facilmente se observavam nas paredes da câmara de secagem.

No seguimento deste estudo foram ainda calculados rendimentos de operação para pós com um tempo de produção superior a 4,5 horas. Assim, na **tabela 3.7** encontram-se os rendimentos correspondentes a cada pó produzidos para uma concentração de hidroxitirosol de 5 %.

Tabela 3.7 – Rendimentos relativos à produção dos pós de duração superior a 4,5 horas de operação com valor esperado de 5 % de hidroxitirosol

Pó com 5% Ht	Matriz	Tin (°C)	Azoto (mm)	Rendimento (%)
C1	RO	125	20	20,0
C2				17,0
C3				43,7
C4				26,8
F1				32,8
F2				25,0
F3				28,0
H	DSS	130	25	18,5
N				77,7
N1				86,8

Da tabela acima confirma-se o facto de haver muito mais perdas nos pós derivados do extracto de RO, traduzindo-se num rendimento de operação muito inferior face aos pós provenientes de um extrato dessorvido. O baixo rendimento evidenciado no processamento e a baixa estabilidade física dos pós derivados do RO levou a empresa a optar pela produção de pós de matriz DSS.

É importante mencionar ainda que, na produção das partículas com deste tipo de matriz, se percebeu que era possível aplicar qualquer temperatura de entrada (desde que fosse suficiente para evaporar a água) sem que deixasse de haver produção, mesmo aumentando o caudal de azoto.

Esta facilidade em produzir pós provenientes de uma matriz de dessorvido veio reforçar a teoria da existência de uma temperatura de transição vítrea nos pós derivados do extrato RO como se havia suspeitado no início do estudo dos mesmos. Assim, procedeu-se à análise de calorimetria de varrimento diferencial (DSC) de um pó de cada matriz como descrito na secção 2.2.12. Foram então seleccionados os pós H e J uma vez que ambos foram submetidos às mesmas condições de operação e são derivados de um RO e de um DSS, respectivamente.

Na figura que se segue encontra-se o gráfico do resultado do varrimento aplicado ao pó H.

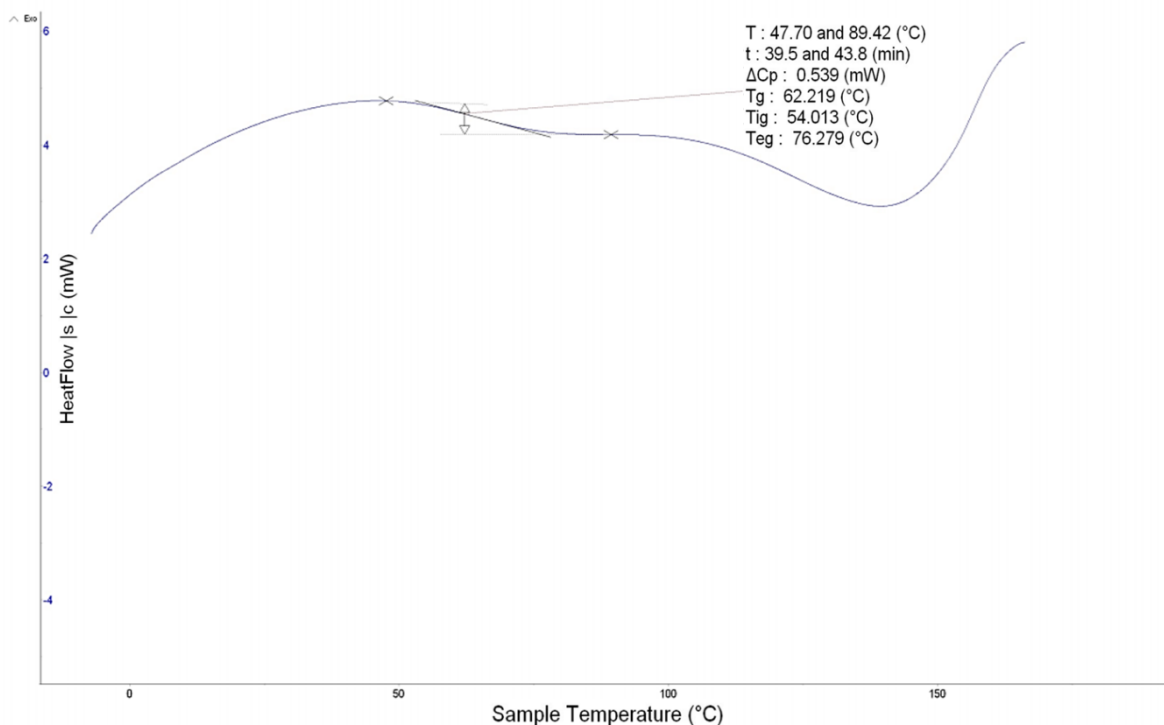


Figura 3.27 – Gráfico do perfil do pó H analisado por DSC com respectivos parâmetros de transição vítrea.

Do gráfico da **figura 3.27** é possível perceber que existe uma temperatura, de 62 °C, à qual o pó derivado do RO volta ao seu estado físico inicial apresentando as características que impedem que o mesmo seja estável e que são típicas de um material amorfo. É importante perceber que esta temperatura funciona como um indicador de que a temperatura de saída, $T_{saída}$, do *spray dryer* estava demasiado elevada e, com isto se pode afirmar que não é possível produzir um pó com origem directa do extracto de RO sem que este seja instável porque para temperaturas de saída inferiores à T_g mencionada não é possível secar o extracto.

Relativamente ao pó J que, por outro lado, deriva de uma matriz cujo RO sofreu um passo de dessorção, o DSS, é possível encontrar o resultado da análise de DSC no gráfico da figura abaixo.

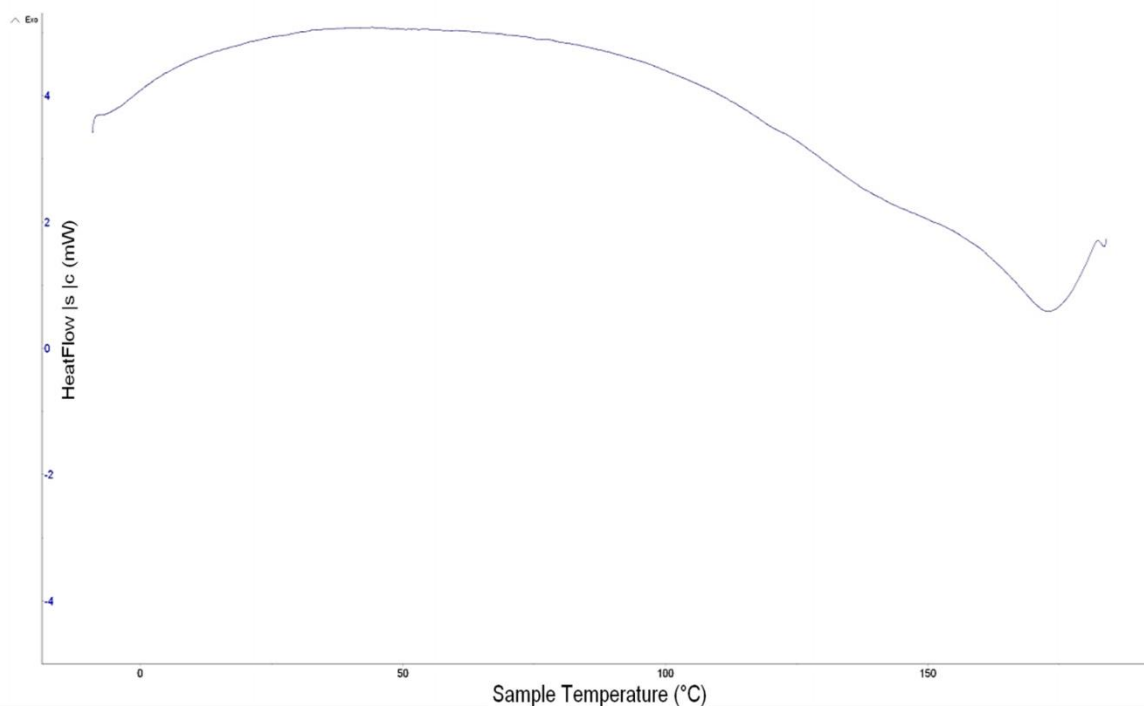


Figura 3.28 - Gráfico do perfil do pó J analisado por DSC.

Pelo perfil apresentado na **figura 3.28** se percebe que o pó J apresenta um comportamento mais próximo de um material cristalino na medida em que não apresenta uma temperatura de transição vítrea. Este facto veio provar a facilidade que existe em obter um pó relativamente estável com origem numa matriz de dessorvido.

A sugestão de que os hidratos de carbono pudessem estar na origem da instabilidade dos pós, conferindo-lhes características de um material amorfo, surgiu durante o processamento dos mesmos nomeadamente por estes serem facilmente visíveis na produção a partir do derivado do RO. Houve assim a necessidade de confirmação deste facto e, como tal, a cada matriz foi aplicado o método *Fenol Sulfúrico* descrito na secção 2.2.4. Para tal foi necessário a elaboração de duas rectas de calibração sendo que numa o solvente aplicado foi a água (para quantificar o RO) noutra o solvente foi uma mistura água-etanol (para quantificar o DSS1 e o DSS2). Estas rectas de calibração podem ser encontradas em anexo, **figuras D1** e **D2**, respectivamente.

A quantificação de hidratos de carbono foi aplicada à matriz de cada pó. Assim, os resultados mostraram que o RO 164 apresenta 3,2 g/ L eq. de glucose, o DSS1 0,1 g/ L eq. glucose e o DSS2 0,2 g/ L eq. de glucose.

É importante referir que esta diferença na quantidade de açúcares era crucial para proporcionar o aparecimento de microorganismos. Assim, quando se preparavam amostras de RO 164 para análise de HPLC, a mesma começava a desenvolver fungos no espaço de uma semana (ver **figura 3.29**). Facto que não era observado quando se preparavam amostras de outros extractos dessorvidos pelo que teria que haver um cuidado acrescido para que após a sua preparação a análise fosse imediata.

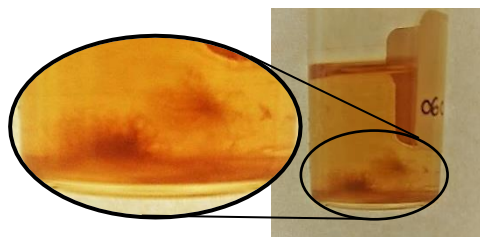


Figura 3.29 – Microorganismos desenvolvidos no extracto de RO 164.

Este acontecimento era também evidenciado na diluição de pós provenientes da matriz acima referida pelo que o mesmo cuidado era preciso ser aplicado.

3.6.1. Caracterização das partículas e enquadramento da concorrência

Como foi dito no subcapítulo anterior, as partículas derivadas do extracto RO são de natureza higroscópica e a tendência a degradar é acelerada com o aumento da concentração de hidratos de carbono presentes na matriz.

O facto de as partículas apresentarem esta característica conduziu à realização do teste de exposição ao ar descrito na secção 2.2.15. Este teste teve como objectivo avaliar a velocidade de degradação de um pó derivado de um concentrado de RO e de um dessorvido (DSS) do processo de adsorção do RO. Para tal, quando se evidenciasse alguma alteração no aspecto era tirada uma fotografia e anotado o tempo que levou à sua deterioração. Assim, para todas as imagens foi necessário ter uma base de comparação com um pó que fosse 100% estável, sendo que para o estudo foi a maltodextrina.

Os pós seleccionados foram o J (proveniente do DSS1) e o H (proveniente do RO 164). Na figura que se segue encontra-se o estado inicial de cada um.

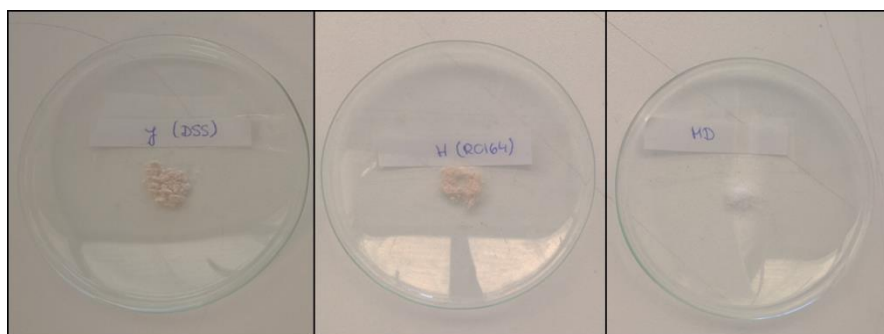


Figura 3.30 – Estado inicial dos pós J e H no teste de exposição ao ar.

Ao fim de uma hora e meia o aspecto foi o seguinte:

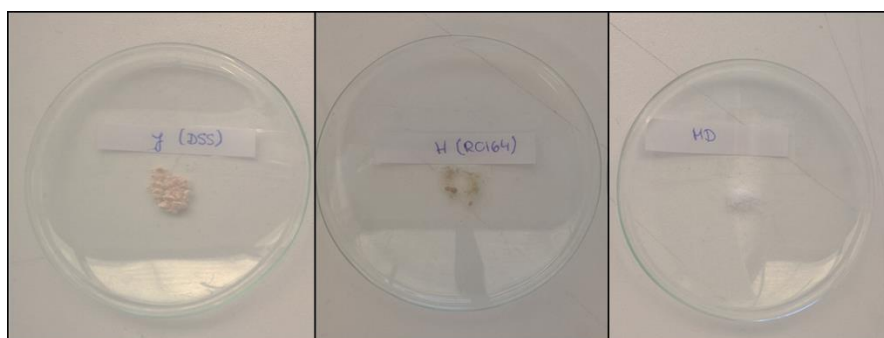


Figura 3.31 - Estado dos pós J e H passadas uma hora e meia no teste de exposição ao ar.

Como era de esperar o pó a deteriorar primeiro foi o H apresentando o aspecto meloso característico, contudo era importante saber se o pó J se apresentava estável.

Assim, ao fim de uma semana o aspecto do J era o apresentado na figura 3.32.

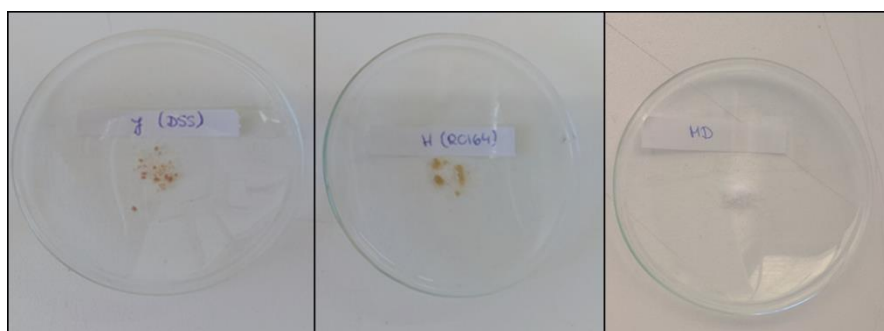


Figura 3.32 - Estado dos pós J e H passado uma semana no teste de exposição ao ar.

Com este estudo se conclui que apesar de o pó J apresentar uma maior resistência à oxidação, todos os pós tinham de ser bem isolados do contacto com o ar de forma a evitar a sua degradação. Desta forma os pós, que eram armazenados em *ependorfs*, passaram a ser embalados em sacos sob vácuo de forma a minimizar ao máximo a razão espaço disponível/espaço ocupado.

O facto de os pós da empresa *Zeyton* serem bastante higroscópicos levou a mesma a procurar soluções para superar esta característica não desejada. Assim, o primeiro passo baseou-se na análise de produtos da concorrência, nomeadamente para se tentar perceber se estes apresentavam o mesmo problema. Para tal foram estudadas as cápsulas da empresa *Derec'til Nature*, **NaturOlive cápsulas**. Pretendia-se averiguar em primeiro lugar a sua composição em hidroxitirosol, a presença dos 4 principais compostos voláteis responsáveis pelo cheiro avinagrado (ácido acético), ranço (ácido butanóico), alcatrão (creosol) e avinhado (4-etilfenol), calcular a sua densidade aparente e sobretudo analisar microscopicamente as partículas. Desta forma, iria ser feita uma caracterização das partículas equiparando-as às da empresa *Zeyton*.

Na imagem que a seguir se apresenta está representado uma das cápsulas utilizadas para o estudo.



Figura 3.33 – Cápsula da empresa *Derectil Nature*.

Estas cápsulas apresentavam uma quantidade de pó de 0,41 g por cápsula, sendo que cada uma pesava entre 0,48 e 0,50 g.

Relativamente à análise em hidroxitirosol, no gráfico da figura abaixo encontra-se o resultado da análise ao pó da cápsula assim como a sua comparação aos pós da *Zeyton*, os quais se podem distinguir conforme o código, contendo a matriz que lhe deu origem e o valor em percentagem de HT esperado.

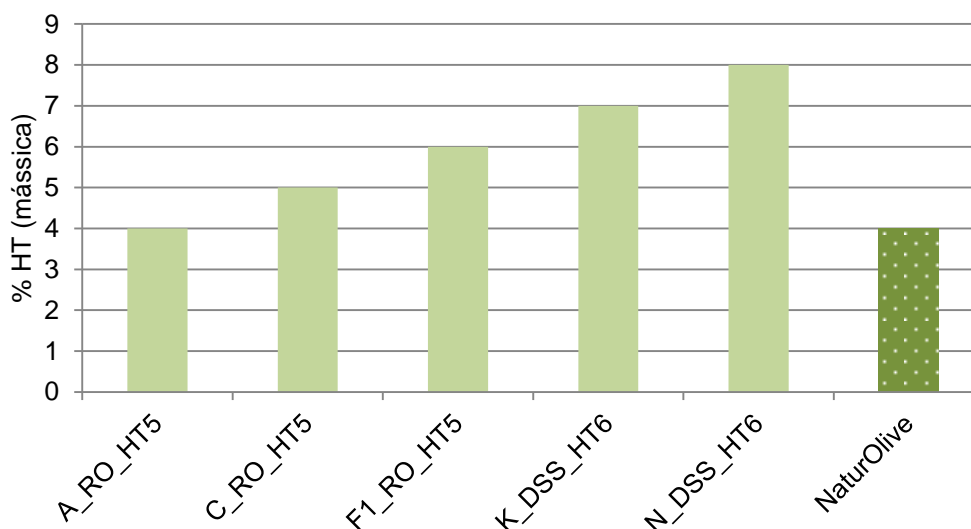


Figura 3.34 – Representação gráfica da percentagem de hidroxitirosol nos pós da *Zeyton* em comparação com o pó *NaturOlive*. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem_percentagem de HT esperada)

Da análise ao gráfico pode-se concluir que o pó da cápsula apresenta uma composição em hidroxitirosol (HT) de 4%, o que é inferior quando comparado a qualquer um dos pós da *Zeyton* derivados da matriz dessorvido (DSS). Apresentando um teor semelhante ao pó A derivado da matriz RO.

Quanto à análise da presença dos principais defeitos provocados pelo odor, na figura abaixo encontram-se representadas as quantidades de cada um para o pó H, J e o pó da cápsula.

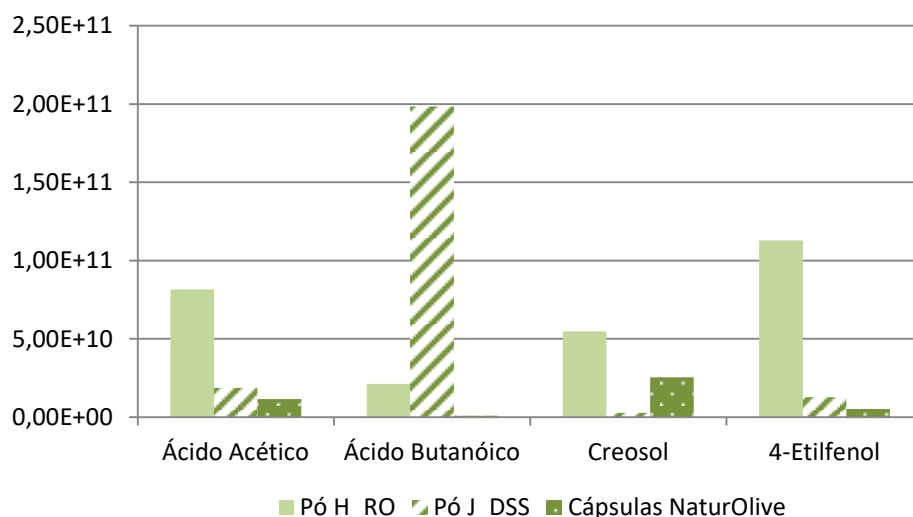


Figura 3.35 – Quantidades relativas de ácido acético, ácido butanóico, creosol e 4-etilfenol para cada tipo de pó. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem)

É possível entender que relativamente ao pó *NaturOlive*, este apresenta uma quantidade mínima destes compostos quando comparado a qualquer um dos pós *Zeyton*. Sendo que o proveniente da matriz dessorvido (DSS) se destaca pela presença do ácido butanóico.

Outro estudo aplicado para a caracterização das partículas foi o da medição da densidade aparente para dois pós de cada matriz e para o *NaturOlive* (ver **figura 3.36**).

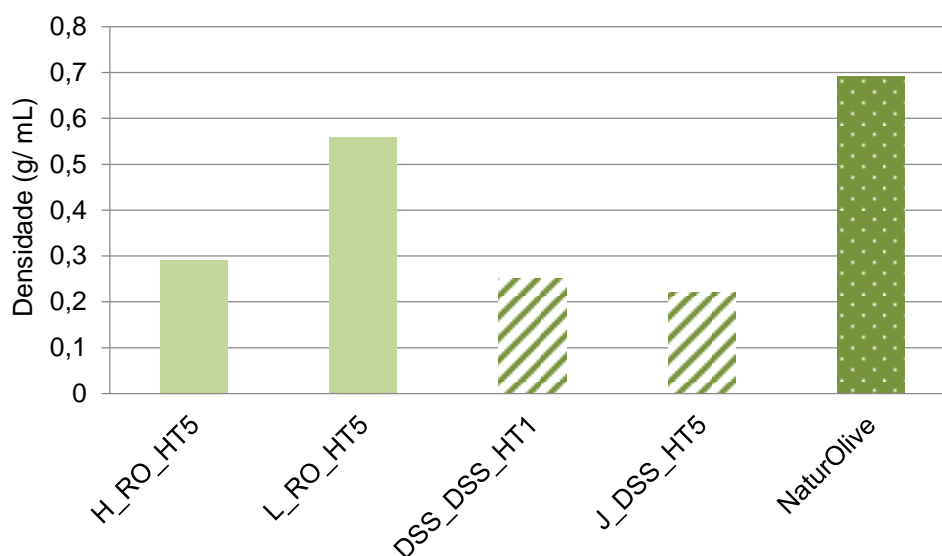


Figura 3.36 – Representação gráfica da densidade aparente de cada pó. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem_ percentagem de HT esperada)

Assim, pela análise ao gráfico, o *NaturOlive* é considerado o pó mais denso, apresentando uma densidade de 0,69 g/ mL que é uma grande diferença face a um qualquer pó derivado de uma matriz de dessorvido (valores tabelados em anexo, **tabela I1**).

Uma vez realizados estes estudos foi fundamental analisar as partículas ao microscópio de forma a determinar o tamanho médio das mesmas e a visualizar o seu aspecto para poder ser feita uma comparação entre partículas da empresa *Zeyton* e partículas da empresa *Derecetil Nature*.

Posto isto, cada pó (H, N, G, DSS e cápsula) foi analisado pelo aparelho *Morphologi* como descrito na secção 2.2.13. Porém os pós, imediatamente antes de serem inseridos no equipamento, tinham de estar secos de forma a minimizar a influência da humidade na determinação do tamanho das partículas. Para tal, procedeu-se à secagem por azoto (com duração de aproximadamente 1 hora) através da montagem do sistema representado na figura abaixo.



Figura 3.37 – Representação do processo de secagem por azoto aplicado a dois pós em simultâneo.

Depois de secos cada pó foi analisado individualmente. As partículas foram designadas por códigos nos quais se tem a letra representativa seguido da matriz que lhe deu origem, composição (em % mássica) de HT esperado e a ampliação no aparelho. Na figura que se segue encontram-se as imagens capturadas pelo equipamento para o pó H e N os quais foram produzidos sob as mesmas condições mas apresentam diferentes quantidades de HT.

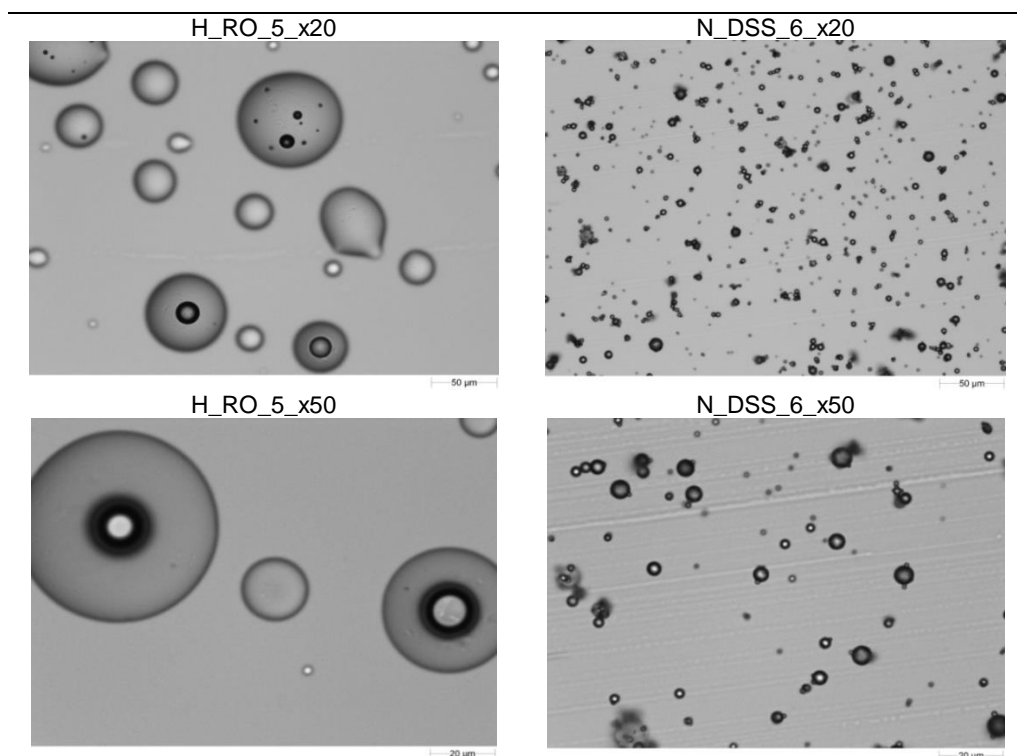


Figura 3.38 – Imagens microscópicas dos pós H e N de matrizes diferentes com ampliação x20 e x50. (código: letra do pó_matriz que lhe deu origem_ampliação)

Das imagens anteriormente apresentadas nota-se uma grande diferença de tamanhos entre as partículas de uma e de outra matriz, no entanto é preciso ter em conta que a incidência da luz durante a análise derretia as mesmas.

Nas figuras que se seguem encontra-se a distribuição em número dos pós H e N, por esta ordem, com o respectivo diâmetro médio e desvio padrão.

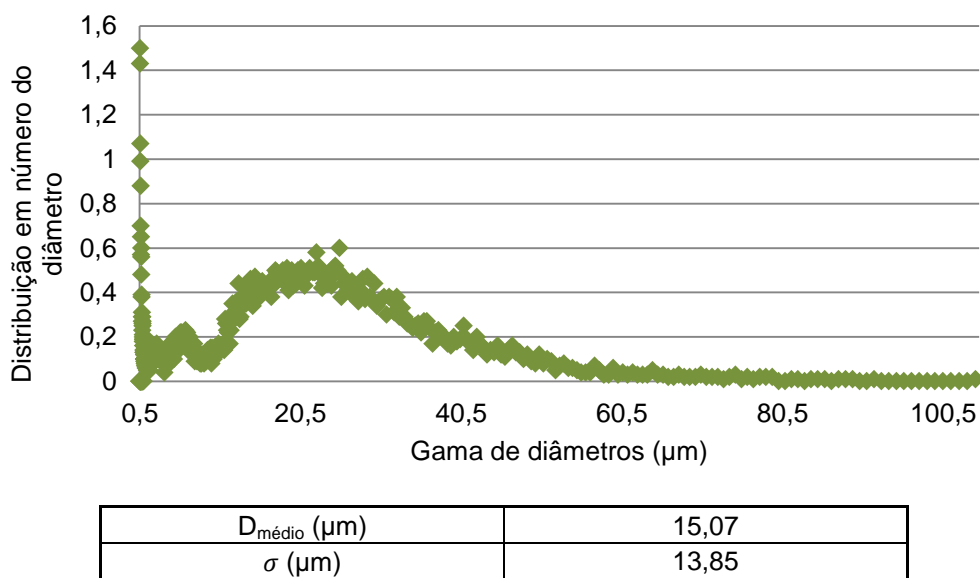


Figura 3.39 – Representação gráfica da distribuição em número do pó H com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).

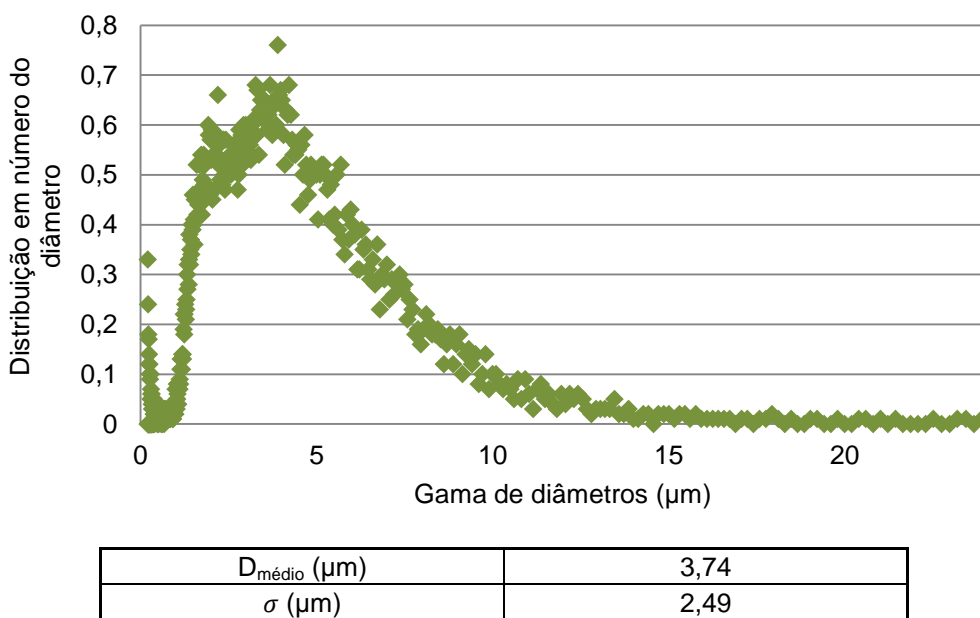


Figura 3.40 - Representação gráfica da distribuição em número do pó N com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).

Com os resultados da distribuição em número do diâmetro das partículas é importante reter dois pontos fundamentais, o primeiro é a homogeneidade das partículas, sendo que no pó N

estas se apresentam mais homogêneas e este facto é evidenciado pela análise ao desvio padrão, que é bastante inferior ao das partículas do pó H. O segundo é o da oxidação a que as partículas estão sujeitas durante o ensaio que contribui para acelerar o processo de degradação das mesmas, traduzindo-se em valores de diâmetro pouco realistas.

Foram ainda analisadas partículas derivadas da mesma matriz (DSS) com diferentes temperaturas de entrada no *spraydryer* e diferentes quantidades de hidroxitirosol. Os códigos atribuídos têm em conta a letra do pó, seguido da temperatura de entrada, quantidade de hidroxitirosol e a ampliação. Assim, na figura que se segue é possível observar as imagens capturadas.

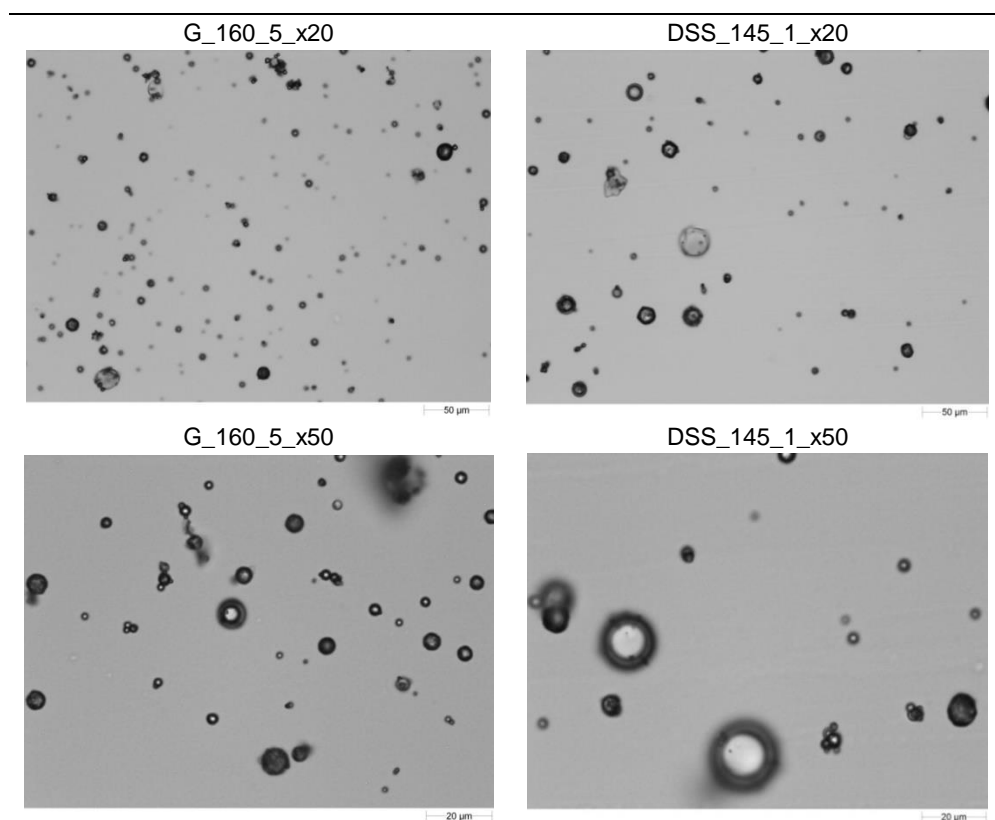
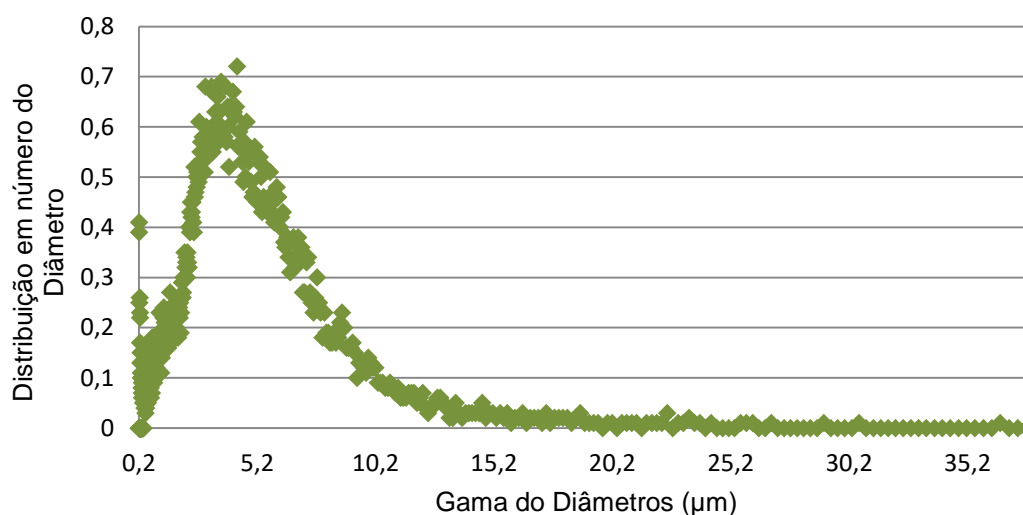


Figura 3.41 - Imagens microscópicas dos pós G e DSS da mesma matriz com ampliação x20 e x50.
(código: letra do pó_temperatura de entrada no *spraydryer*_quantidade de HT_ampliação)

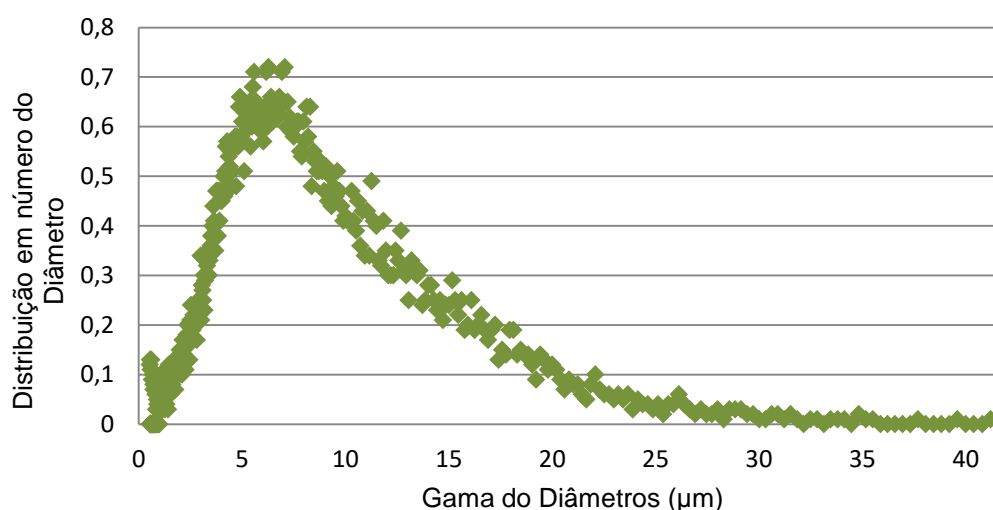
Comparando as imagens acima é possível notar um aumento na diversidade de tamanhos nas partículas do pó DSS. A mancha branca, notada no centro das mesmas, poderá ser indicadora de deterioração devido à incidência da luz do aparelho.

Nas imagens que se seguem estão representados a distribuição em número dos pós G e DSS, por esta ordem, com o respectivo diâmetro médio e desvio padrão.



$D_{\text{médio}} (\mu\text{m})$	3,83
$\sigma (\mu\text{m})$	2,9

Figura 3.42 - Representação gráfica da distribuição em número do pó G com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).



$D_{\text{médio}} (\mu\text{m})$	7,23
$\sigma (\mu\text{m})$	4,86

Figura 3.43 - Representação gráfica da distribuição em número do pó DSS com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).

Segundo a literatura, um aumento da temperatura no *spraydryer* provoca a produção de partículas com um diâmetro maior ^[38], contudo há que ter em conta que ambos os pós foram produzidos a um caudal diferente (6 mL/ min para o G e 9 mL/ min para o DSS), o que influencia o tamanho das mesmas. Também a quantidade de maltodextrina utilizada foi diferente e, sendo que um aumento da concentração da mesma provoca um aumento do diâmetro nas partículas, o DSS que apresenta uma concentração 6 vezes maior que a usada no G apresentou partículas maiores, encontrando-se de acordo com a literatura ^[39]. Todos estes factores levaram à formação de partículas mais homogêneas no pó G comparativamente ao DSS.

De forma a analisar o pó das cápsulas *NaturOlive* foram realizadas comparações com os pós da empresa *Zeyton* cuja matriz é um dessorvido. Definiram-se códigos consoante o pó, quantidade de HT presente e ampliação de imagem. Na **figura 3.47** é possível observar a forma das partículas de cada pó.

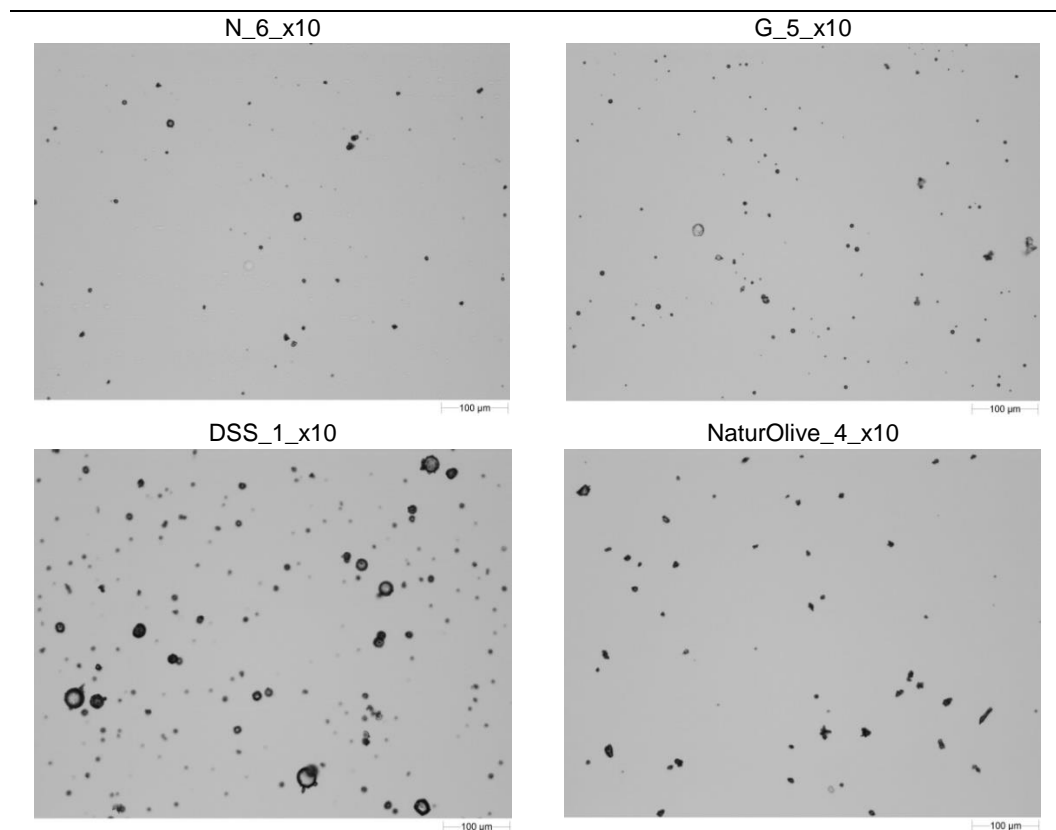
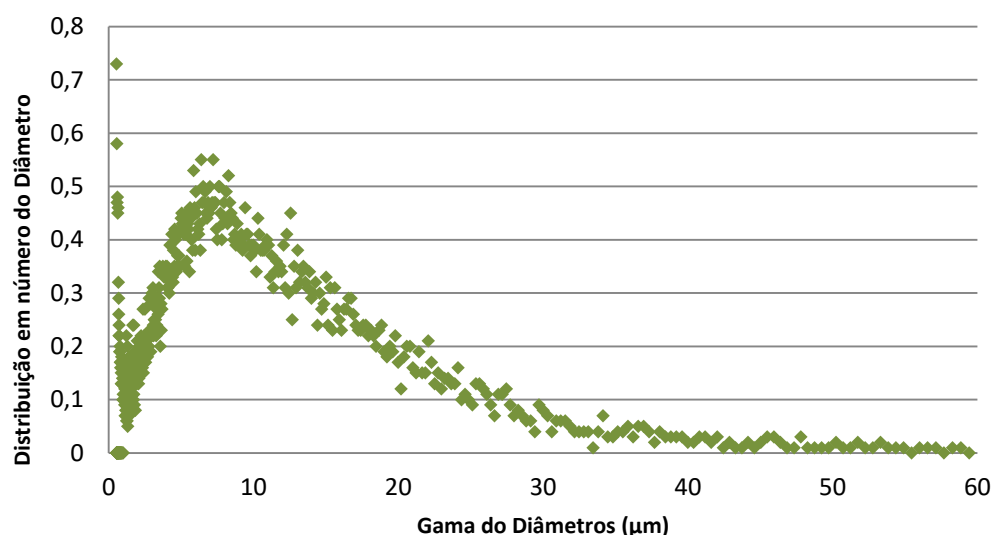


Figura 3.44 - Imagens microscópicas dos pós N, DSS, G e *NaturOlive* com ampliação x20. (código: letra do pó_quantidade de HT_ampliação)

Da análise à **figura 3.44** conseguem-se ver algumas semelhanças entre o pó *NaturOlive* e os dessorvidos N e G nomeadamente no tamanho das mesmas. Também o tamanho das partículas do DSS se assemelham se se desprezar as partículas que já se encontram afectadas pela luz do *Morphologi*.

De forma análoga, foi calculada a distribuição em número das partículas da cápsula *NaturOlive* pelo que o resultado se encontra expresso na **figura 3.45**.



$D_{\text{médio}} (\mu\text{m})$	8,4
$\sigma (\mu\text{m})$	8,76

Figura 3.45 - Representação gráfica da distribuição em número do pó das cápsulas *NaturOlive* com a indicação do respectivo diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$) e desvio padrão (σ).

Daqui se pode reter que o *NaturOlive* apesar de, na imagem da **figura 3.45**, aparentar ter partículas com o mesmo tamanho que as dos dessorvidos da *Zeyton*, se obteve um desvio padrão bastante elevado. A verdade é que quando se analisaram estas partículas mais detalhadamente, isto é com maiores ampliações, constatou-se a presença de um composto que aparentava ser carvão activado, (ver **figura 3.46**), uma vez que este tipo de produto é muito utilizado na indústria farmacológica para conferir estabilidade aos pós que apresentam higroscopicidade.

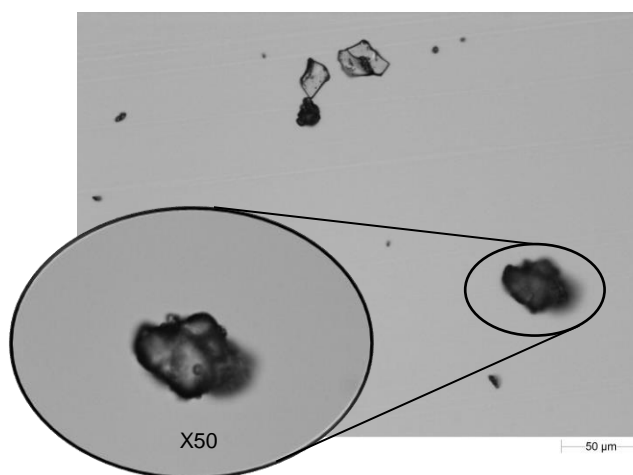


Figura 3.46 - Ampliação de um aglomerado presente no pó das cápsulas *NaturOlive*

Esta constatação da possível presença de compostos antiemectantes que ajudam na estabilidade do pó poderá ser uma boa sugestão na incorporação dos mesmos nos pós da empresa *Zeyton*, já que eles são capazes de absorver a humidade sem se tornarem fisicamente húmidos, reduzindo também a tendência da adesão das partículas.

4. Conclusão

Com a realização deste trabalho foi possível constatar a elevada estabilidade em polifenóis do concentrado de osmose inversa, sendo que para um período de 13 meses, o hidroxitirosol e o tirosol se apresentaram estáveis com um valor de 12 e 2 g/ L, respectivamente.

Relativamente ao estudo dos concentrados evaporados é possível afirmar que, mesmo sob condições que desencadeiam a oxidação, estes apresentaram um valor constante de cerca de 150 g/ L em hidroxitirosol para um período de 4 meses, destacando-se o facto de o concentrado conservado na estufa permitir ainda a eliminação de grande parte dos voláteis, contudo contribui para a degradação do HT. Sendo que um produto concorrente, o *AquaOlive*, também apresentou estabilidade com um valor aproximado de 120 g/L à temperatura ambiente para 2 meses.

No que diz respeito à preparação de um concentrado aquoso, é possível, com etanol, reduzir significativamente o cheiro avinagrado.

Em relação ao estudo da conservação de azeites aditivados iniciado pela empresa, os azeites conservados a uma temperatura de 5°C revelaram-se mais estáveis. Relativamente aos azeites conservados à temperatura ambiente, estes apresentaram um valor estável para o período estudado sendo que, em comparação com o azeite *NaturOlive*, este apresentava uma concentração muito próxima apesar de nada se saber acerca da idade do mesmo.

Do estudo das micropartículas obtidas pela secagem do concentrado de osmose inversa se conclui que é possível obter um pó relativamente estável somente se o extrato RO for submetido a um processo de adsorção/dessorção. Este pó é capaz de apresentar uma concentração de 5 % (em massa) de hidroxitirosol que é superior à concentração presente nas cápsulas do *NaturOlive* (de 4%). Deve ainda ser bem isolado da luz e do ar atmosférico de forma a evitar ao máximo a sua oxidação. Ainda no seguimento deste estudo, a deteção de partículas que se assemelham a compostos antiumectantes nas cápsulas da *Derectil Nature* é um factor a ter em consideração pela empresa.

Para trabalhos futuros sugere-se a conclusão do estudo da estabilidade dos pós e a formulação de outros produtos enriquecidos em hidroxitirosol como cremes, sabonetes ou até mesmo pastilhas.

5. Bibliografia

- [1] "Organização Mundial da Saúde (OMS)," Sheet Fact, May 2011. [Online].
- [2] R. Santos, A. Gagliardi, H. Xavier, C. Magnoni, R. Cassani, A. Lottenberg, F. A. Casella, D. Araújo, F. Cesena, R. Alves, G. Fenelon, S. Nishioka, A. Faludi, B. Geloneze, C. Scherr, C. Kovacs e C. Tomazzela, "Arquivos Brasileiros de Cardiologia," Scielo, 2013. [Online].
- [3] T. Tong, N. J. Wareham, K.-T. Khaw, F. Imamura e N. G. Forouhi, "Prospective Association of the Mediterranean Diet with Cardiovascular Disease Incidence and Mortality and its Population Impact in a Non-Mediterranean Population: the EPIC-Norfolk Study," *BMC Medicine*, 29 September 2016.
- [4] M. Covas, V. Konstantinidou e M. Fitó, "Olive Oil and Cardiovascular Health," *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 54, p. 477–482, Dezembro 2009.
- [5] A. H. Stark e Z. Madar, "Olive Oil as a Functional Food: Epidemiology and Nutritional Approaches.," vol. 60, pp. 170-176, 2002.
- [6] M.-I. Covas, Ruiz-Guitérrez, R. d. I. Torre, A. Kafatos, R. M. Lamuela-Raventós, J. Osada, R. W. Owen e F. Visioli, "Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans.," *Nutrition Rev.*, vol. 64, pp. S20-S30, 2006.
- [7] E. Waterman e B. Lockwood, "Active components and clinical applications of olive oil," *Alternative Medicine Review*, December 2007.
- [8] J. Alburquerque, J. González, D. García e J. Cegarra, "Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction.," *PubMed*, vol. 91, pp. 195-200, January 2004.
- [9] E. Marco, M. Savarese, A. Paduano e R. Sacchi, "Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters," *Food Chemistry*, vol. 104, pp. 858-867, 2007.
- [10] L. Lesage-Meessen, D. Navarro, S. Maunier, J.-C. Sigoillot, J. Lorquin e M. e. a. Delattre, "Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems," *Food Chemistry*, vol. 75, pp. 501-507, 2001.
- [11] H. Obied, M. Allen, D. Bedgood, P. Prenzler, R. K. e R. Stockmann, "Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 823-837, 2005.
- [12] R. Borja, E. Sánchez, F. Raposo, B. Rincón, J. A.M. e M. A., "A study of the natural biodegradation of two-phase olive mill solid waste during its storage in a evaporation pond," *Waste Management*, vol. 26, pp. 477-486, 2006.
- [13] F. Visionli, G. Bellomo e C. Galli, "Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols," *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 247, pp. 60-64, 1998.
- [14] Edgar181-Imagem, *Hydroxytyrosol structure*, 2007.

- [15] Benrr101-Imagem, *Tyrosol*, 2012.
- [16] H. K. Obied, P. D. Prenzler, D. Ryan, M. Servili, A. Taticchi, S. Esposto e K. Robards, "Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 25, p. 1167–1179, 2008.
- [17] P. Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero e A. Fernández-Gutiérrez, "Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples," *Molecules*, vol. 15, pp. 8813-8826, 2010.
- [18] G. Gomes Cotinguiba, J. Rocksane do Nascimento Silva, R. Rackel de Sá Azevedo, T. J. Matos Rocha e A. Feitosa dos Santos, "Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review," *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, vol. 15(3), pp. 231-237, 2013.
- [19] J. Joseph, G. Cole, E. Head e D. Ingram, "Nutrition, Brain Aging, and Neurodegeneration," *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, p. 12795–12801, 2009.
- [20] M. F. Portugal da Costa Romeu, "Desenvolvimento de alimentos funcionais enriquecidos em polifenóis de azeitona," FCT-UNL, 2016.
- [21] M. -I. Covas, K. Nyyssönen, H. E. Poulsen, J. Kaikkonen, H. -J. F. Zunft, H. Kieseewetler, A. Gaddi, R. d. I. Torre, J. Mursu, H. Bäumler, S. Nascetti, J. T. Salonen, M. Fitó, J. Virtanen e J. Marrugat, "The Effect of polyphenols in Olive Oil on Disease Risk Factors. A Randomized Trial," *Ann Intern Med*, vol. 145, pp. 333-341, 2006.
- [22] EFSA, "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in Olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006," *Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies Journal*, vol. 9 (4), pp. 1-25, 2011.
- [23] L. S. Liliana de Jesus, "Monitorização, ao longo de 12 meses dos teores de peróxidos, aldeídos e clorofila de azeites virgem extra, monovarietais e de mistura, produzidos em Portugal e armazenados em 4 diferentes condições," 2014.
- [24] M. Nunes da Ponte, J. L. C. Santos, A. Matias, A. V. M. Nunes, C. M. M. Duarte e J. G. Crespo, "Method of Obtaining a Natural Hidroxitirosol-rich Concentrate from Olive Tree Residues and Subproducts using Clean Technologies". Patente WO2007013032 A2, 28 January 2008.
- [25] P. A. Ferreira Mendes, "Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes," 2012.
- [26] M. Suárez, M.-P. Romero, T. Ramo, A. Macià e M.-J. Motilva, "Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for potencial Application as Food Antioxidants," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, pp. 1463-1472, 2009.
- [27] J. Lozano-Sánchez, M. Castro-Puyana, J. A. Mendiola, A. Segura-Carretero, A. Cifuentes e E. Ibáñez, "Recovering Bioactive Compounds from Olive Oil Filter Cake by Advanced Extraction Techniques," *Int. J. Mol.Sci.*, vol. 15, pp. 16270-16283, 2014.

- [28] N. Allouche, I. Fki e S. Sayadi, "Toward a Hight Yield Recoveri of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 267-273, 2004.
- [29] M. Mosca, A. Diantom, F. Lopez, L. Ambrosone e A. Ceglie, "Impact of antioxidants dispersions on the stability and oxidation of water-in-olive-oil emulsions," *Eur Food Res Technol*, vol. 236, p. 319–328, 2013.
- [30] X. Cao, R. Vassen, S. Schwartz, W. Jungen, F. Tietz e D. Stoever, "Spray-drying of ceramics for plasma-spray coating," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 20, pp. 2433-2439, 2000.
- [31] T. Pelkonen-Imagem, "Laboratory-scale spray dryer," 2009.
- [32] N. Michail, "Ingredion cracks the code to transform 'almost any liquid' into a powder," *Breaking News on Supplements, Health & Nutrition - Europe*, p. 1, 20 July 2017.
- [33] M. A. Dias Marques, "Processo de adsorção / dessorção para a purificação de um extrato natural rico em hidroxitirosol: Otimização do processo batch," FCT-UNL, 2017.
- [34] L. Waterhouse A., ""Determination of Total Phenolics" in Current Protocols in Food Analytical Chemistry". 2001.
- [35] T. Masuko, A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S. Nishimura e Y. Lee, "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format.," *Anal. Biochem*, vol. 339, p. 69–72, 2005.
- [36] M. Fazaeli, Z. Emam-Djomeh, A. K. Ashtari e M. Omid, "Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder," *Elsevier*, vol. 90, n.º Food and Bioproducts Processing, p. 667–675, 2012.
- [37] M. O. Sousa Pereira, "Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos," 2010.
- [38] J. J. Nijdam e T. A. G. Langrish, "The effect of surface composition on the functional properties of milk powders," *Journal of Food Engineering*, vol. 77, pp. 919-925, 2006.
- [39] R. V. Tonon, C. Brabet e M. D. Hubinger, "Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying," *Journal of Food Engineering*, vol. 88, pp. 411-418, 2008.

Anexos

Anexo A

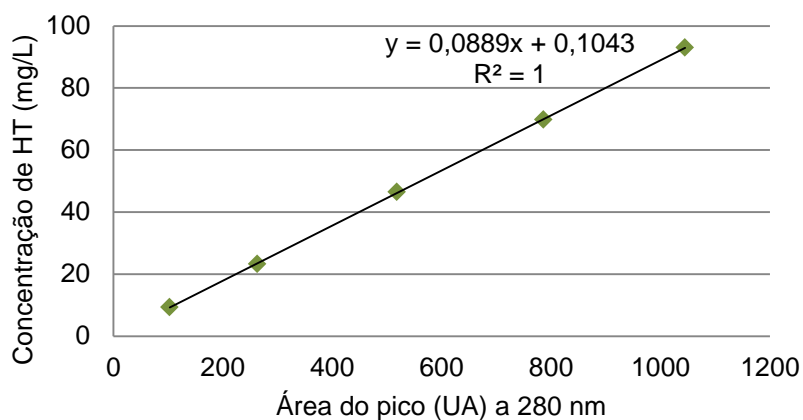


Figura A1- Recta de calibração do hidroxitirosol aplicada no método HPLC. (01/08/2017)

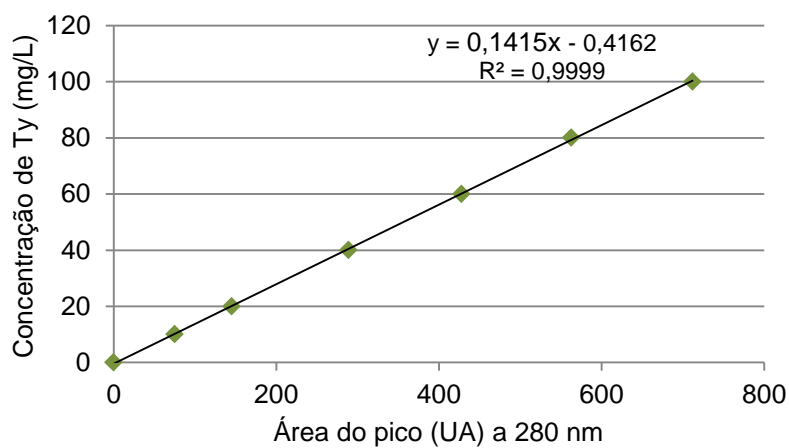


Figura A2- Recta de calibração do tirosol aplicada no método HPLC. (01/08/2017)

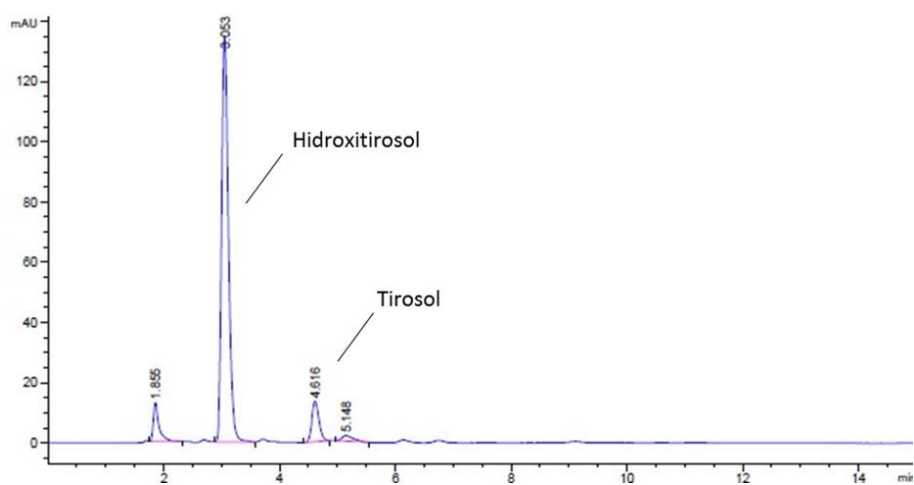


Figura A3- Cromatograma de um concentrado de osmose inversa obtido em HPLC. (01/08/2017)

Anexo B

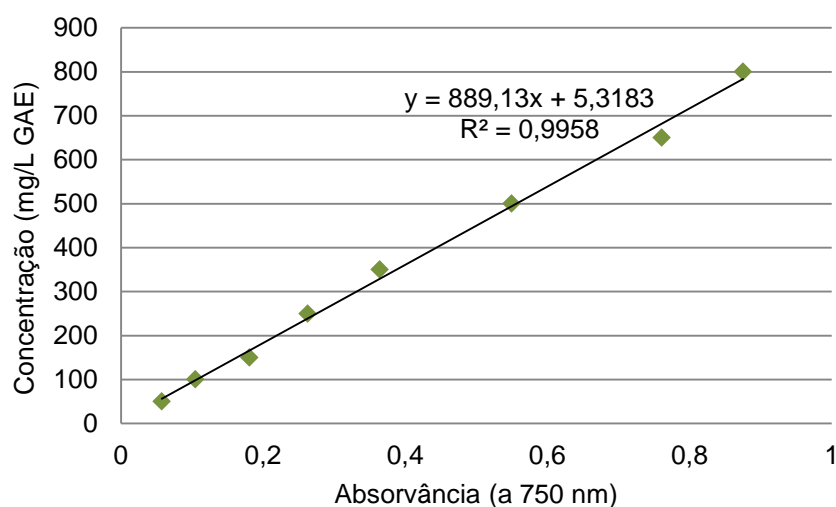


Figura B1- Recta de calibração utilizada no método colorimétrico *Folin-Ciocalteu*. (21/06/2017)

Anexo C

Data	Dias	Meses	Ht (ppm)	Ty (ppm)
14-07-2016	0	0,0	-	-
15-07-2016	1	0,0	13233	2028
26-07-2016	12	0,4	14323*	2568
26-10-2017	104	3,4	11988	2222
31-01-2017	201	6,5	10655	2140
13-02-2017	214	7,6	10640	2265
21-02-2017	222	7,9	9821*	1906
10-03-2017	239	7,7	11683	1957
21-03-2017	250	8,1	12963	1959
27-03-2017	256	8,3	11779	1864
06-04-2017	266	8,9	12875	1071
11-04-2017	271	9,0	11413	2170
11-05-2017	311	10,0	12449	2107
18-05-2017	318	10,3	11312	1969
23-05-2017	323	10,4	11170	1993
30-05-2017	330	10,6	10810	1971
07-06-2017	337	11,2	11910	1948
14-06-2017	344	11,5	11698	1795
28-06-2017	358	11,9	12241	2107
13-07-2017	373	12,0	12882	2184
19-07-2017	379	12,2	12720	2200
01-08-2017	392	12,6	12770	2361

*valores desprezados

Tabela C1- Tabela de valores relativos à composição em hidroxitirosol e tirosol do concentrado de osmose inversa (RO164) ao longo do tempo.

Anexo D

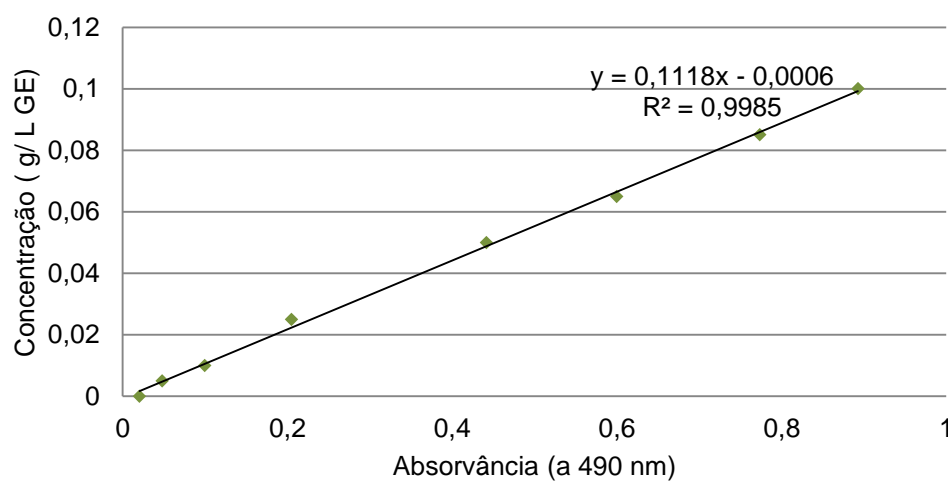


Figura D1- Recta de calibração com H₂O utilizadas para a quantificação de hidratos de carbono.
(02/08/2017)

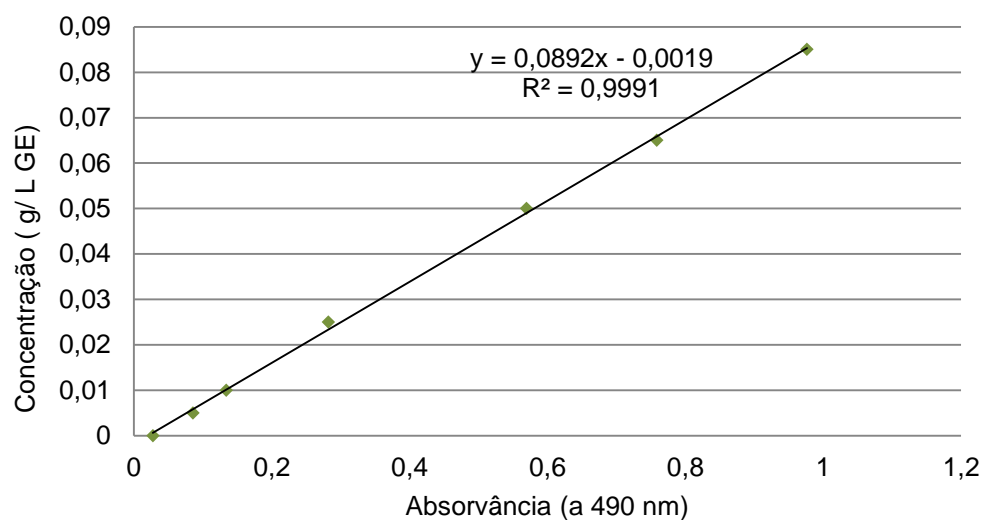
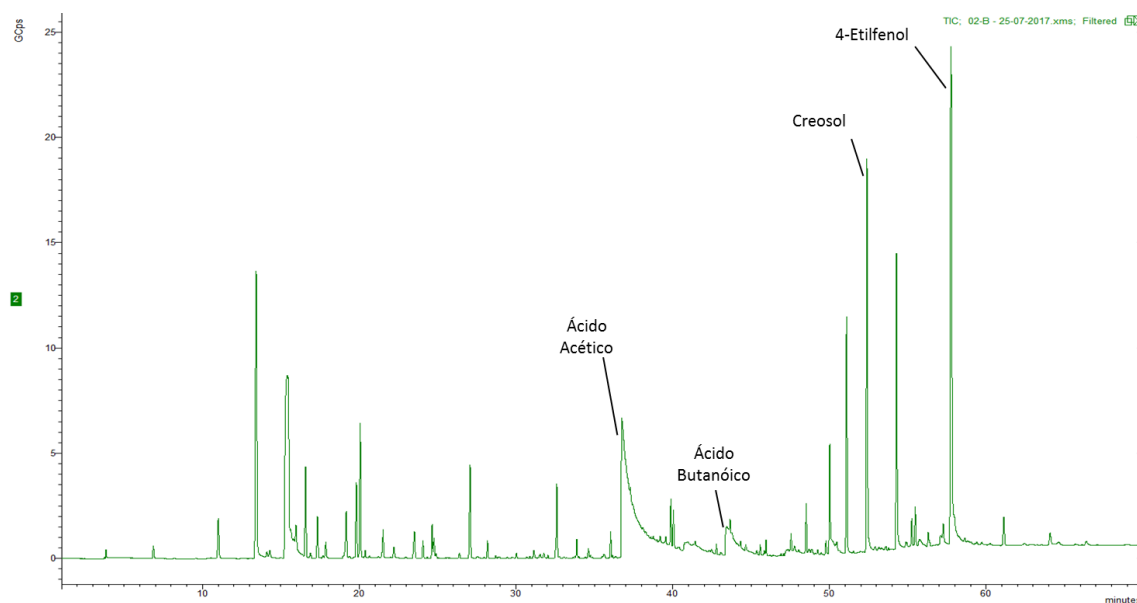


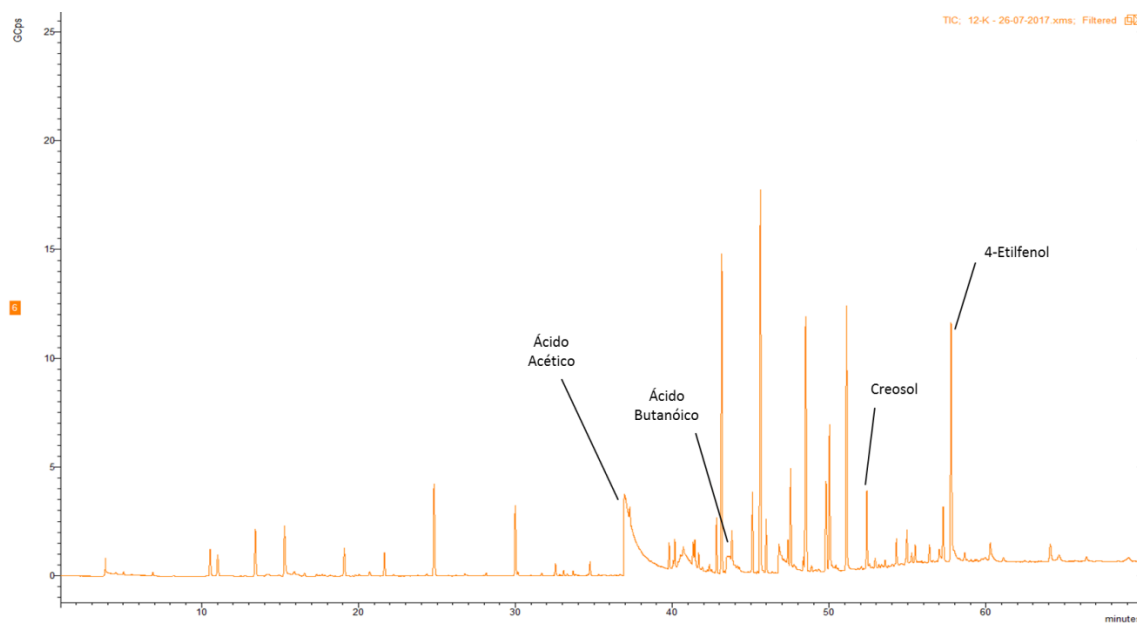
Figura D2- Recta de calibração com H₂O+ETOH utilizadas para a quantificação de hidratos de carbono.
(02/08/2017)

Anexo E



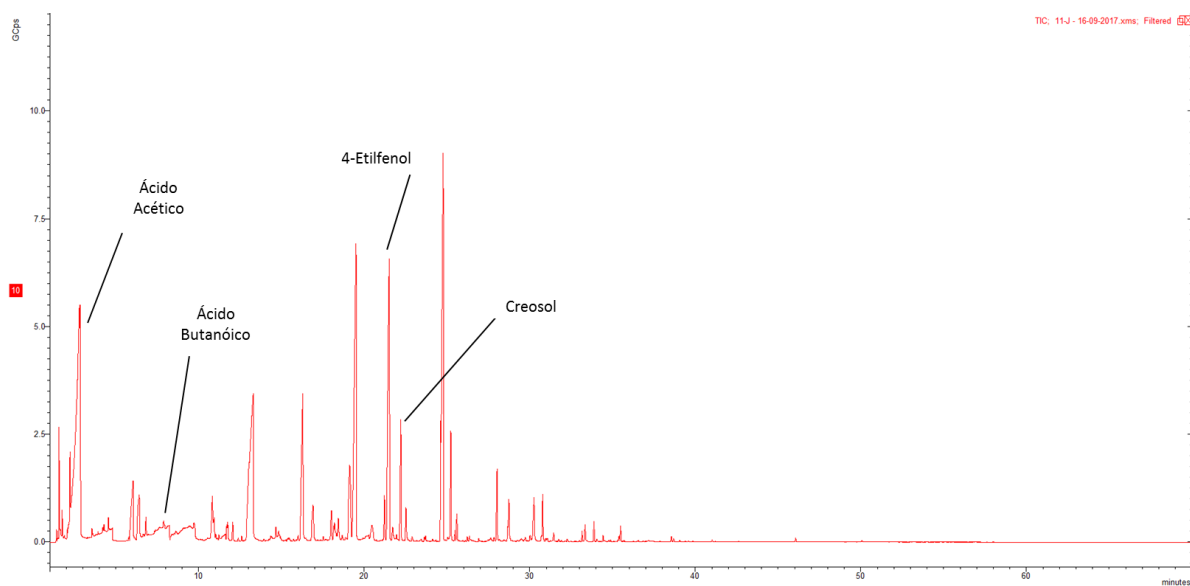
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	2,00E+11	2,08E+09	8,58E+10	1,49E+11

Figura E1- Cromatograma do RO 164 com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (01/08/2017)



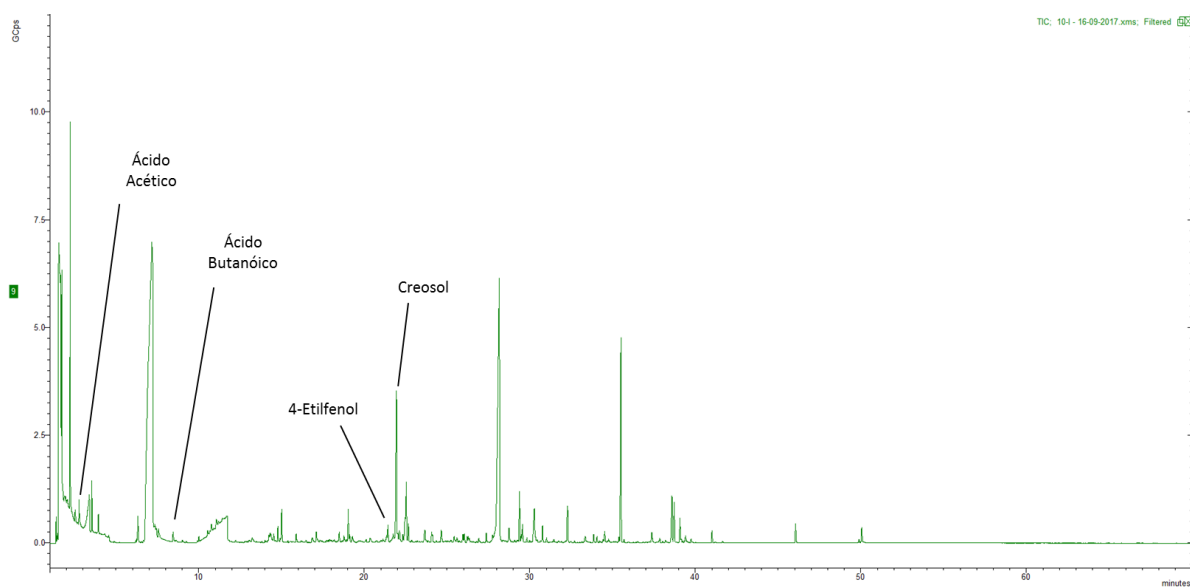
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,44E+11	5,10E+07	1,42E+10	5,44E+10

Figura E2- Cromatograma do RO 164 evaporado conservado na estufa com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (01/08/2017)



	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	9,95E+10	1,07E+10	9,33E+09	4,34E+10

Figura E3- Cromatograma do RO 164 evaporado conservado à temperatura ambiente com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (18/09/2017)



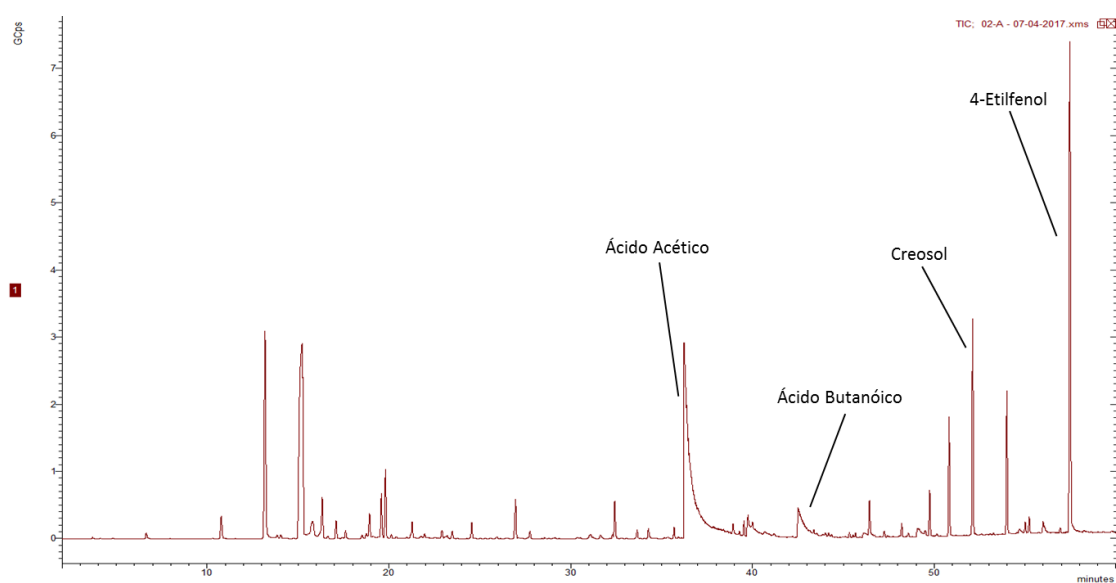
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	6,36E+09	1,14E+10	5,71E+09	1,20E+10

Figura E4- Cromatograma do concentrado AquaOlive conservado à temperatura ambiente com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (18/09/2017)

Anexo F

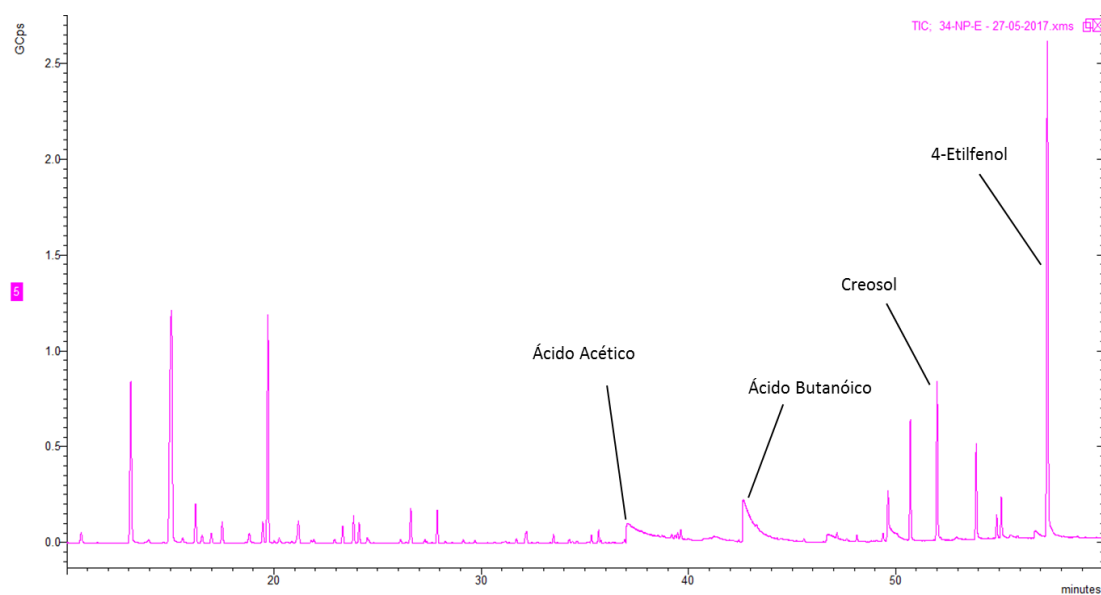
	HT (mg/L)
RO 161 com Glicerol	21515
RO 161 com Etanol	15703
RO 164 com Glicerol	27645
RO 164 com Etanol	9739
DSS com Glicerol	3211

Tabela F1- Resultados HPLC do respectivo concentrado relativo à análise de incorporação de Hidroxitirosol (27/03/2017)



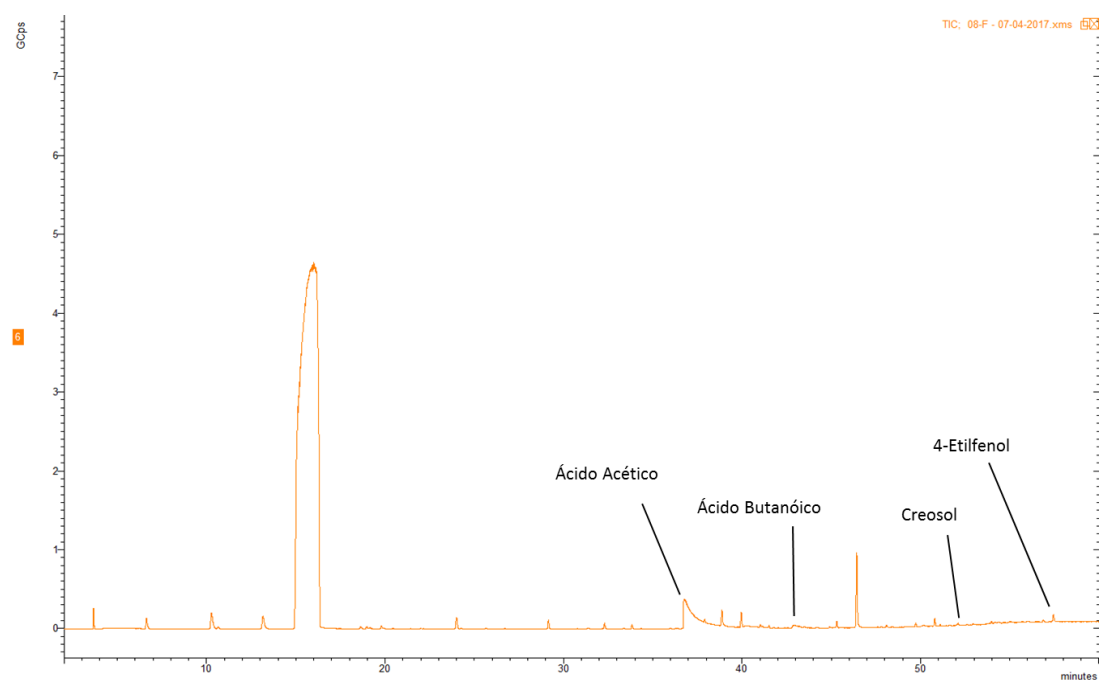
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	5,02E+10	5,57E+09	1,31E+10	3,61E+10

Figura F1- Cromatograma do RO 164 com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (06/04/2017)



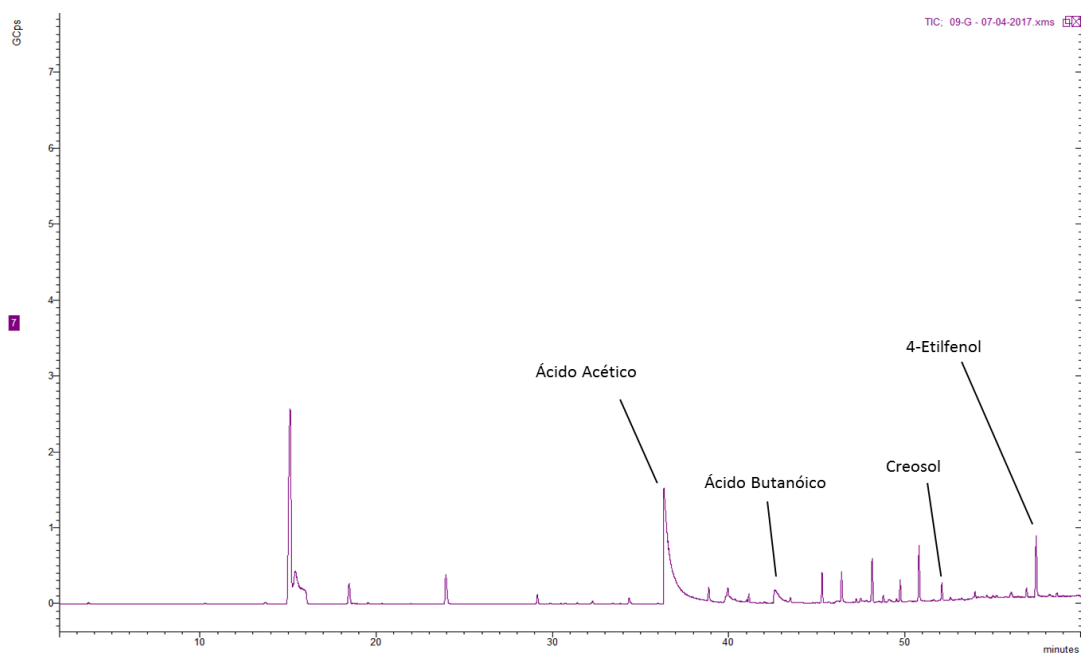
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	8,02E+10	5,49E+10	7,52E+10	2,60E+10

Figura F2- Cromatograma do RO 161 com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (06/04/2017)



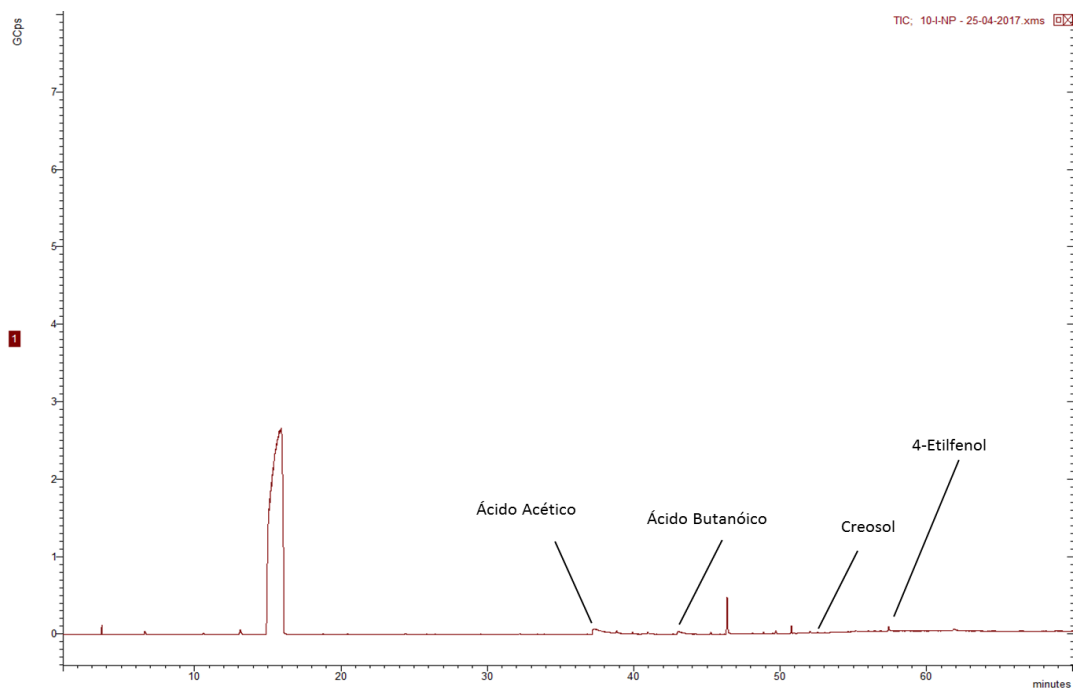
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,05E+10	4,21E+08	1,80E+08	4,29E+08

Figura F3- Cromatograma do RO 164 com etanol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (06/04/2017)



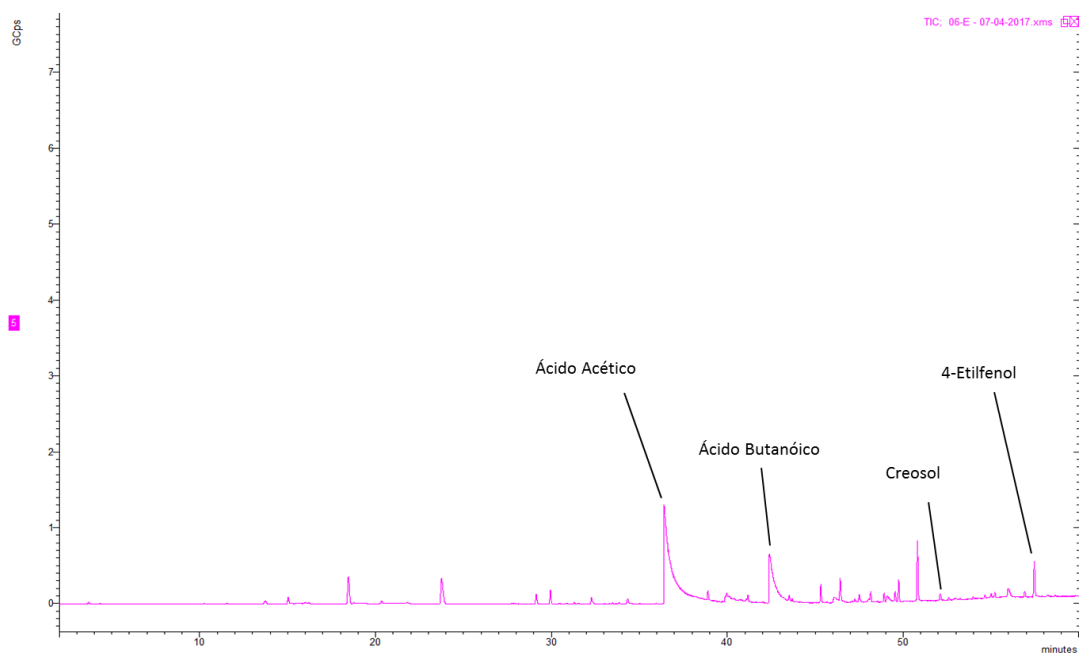
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,16E+10	1,28E+09	3,16E+08	1,22E+09

Figura F4- Cromatograma do RO 164 com glicerol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho.
(30/05/2017)



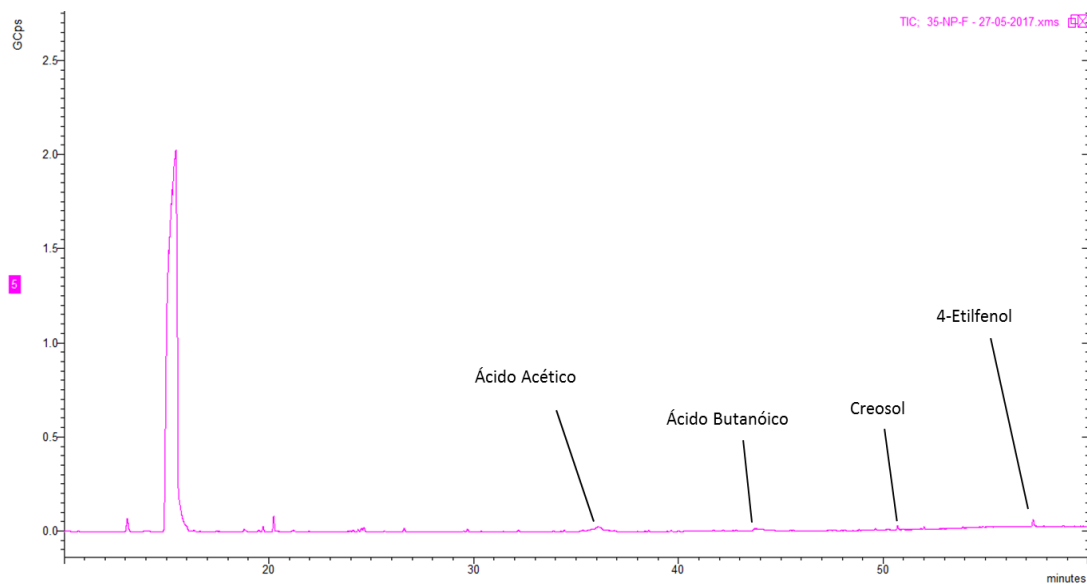
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	2,54E+09	6,07E+08	6,26E+06	2,42E+08

Figura F5- Cromatograma do RO 161 com etanol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho.
(06/04/2017)



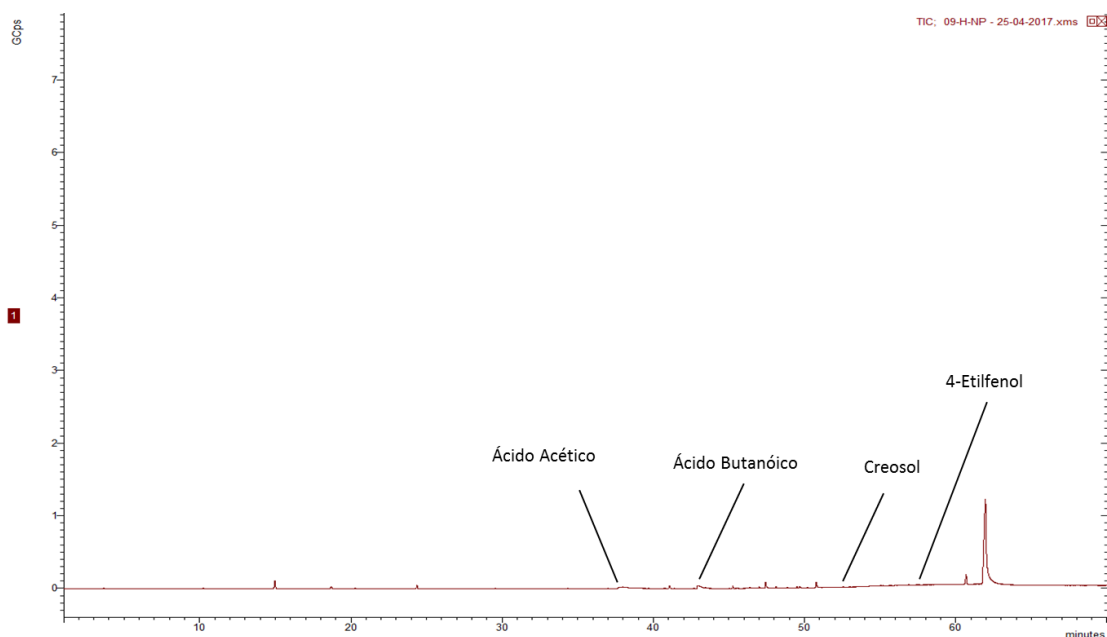
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,63E+10	6,35E+09	2,09E+08	1,04E+09

Figura F6- Cromatograma do RO 161 com glicerol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (06/04/2017)



	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,06E+09	1,04E+09	2,32E+06	3,26E+07

Figura F7- Cromatograma do DSS1 com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (30/05/2017)



	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	2,08E+08	2,09E+08	1,37E+07	1,64E+07

Figura F8- Cromatograma do DSS1 com glicerol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (06/04/2017)

Anexo G

Meses	AZHT16114TA		AZHT16115TA	
	HT+Ty (mg/L)	HT+Ty (μmol)	HT+Ty (mg/L)	HT+Ty (μmol)
0,8	432	2932,4	306	2076,6
1,6	-	-	-	-
3,3	212	1460,9	-	-
3,8	-	-	-	-
4,5	262	1788,6	174	1188,6
5,5	264	1807,6	194	1328,3
6,2	206	1409,9	169	1159,9
7,6	221	1510,3	142	974,8
8,8	178	1222,1	187	1286,6
9,7	212,4	1455,1	170,4	1168,8
10,7	157,2	1097,6	159,6	1091,5
12,1	219,6	1505,5	153,6	1055,2
12,9	160,8	1736,9	118,8	973,7

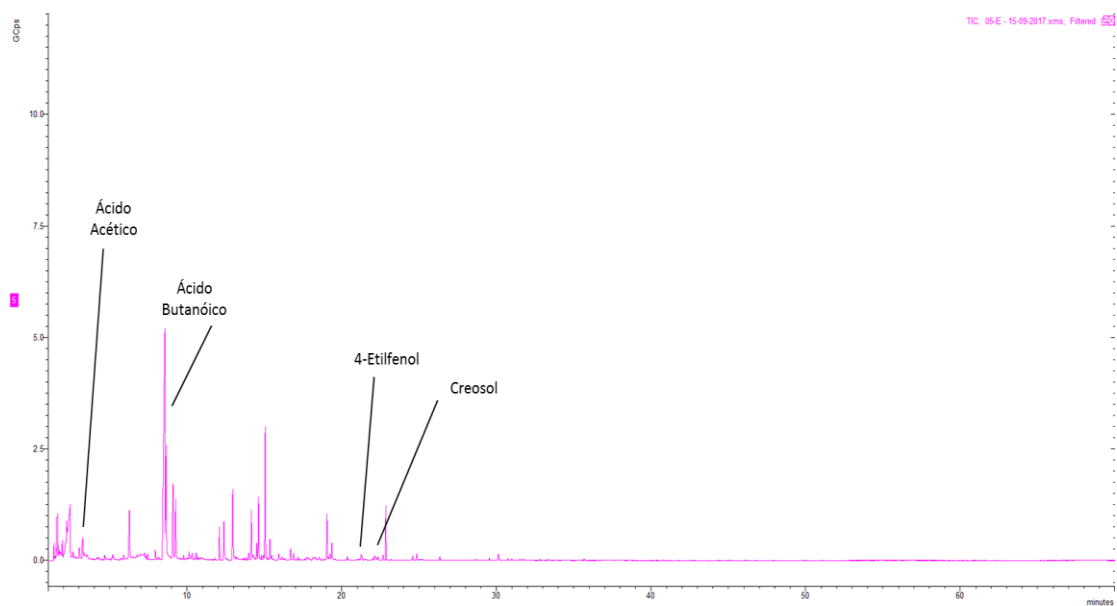
Tabela G1- Concentrações de HT+Ty para o azeite aditivado sob solução aquosa (AZHT16114TA) e azeite aditivado com glicerol (AZHT16115TA) à temperatura ambiente.

Meses	AZHT16114E		AZHT16115E	
	HT+Ty (mg/L)	HT+Ty (μmol)	HT+Ty (mg/L)	HT+Ty (μmol)
0,8	256	1747,4	323	2190,8
1,6	-	-	-	-
3,3	-	-	-	-
3,8	201	1383,5	172	1186,1
4,5	-	-	-	-
5,5	182	1255,6	178	1227,4
6,2	201	1389,5	170	1176,2
7,6	139	970,4	146	1014,3
8,8	150	1042,5	121	840,7
9,7	160,8	1115,5	153,6	1059,7
10,7	169,2	1175,5	97,2	678,2
12,1	146,4	1022	104,4	727,6
12,9	100,8	232,6	80,4	238,6

Tabela G2- Concentrações de HT+Ty para o azeite aditivado sob solução aquosa (AZHT16114E) e azeite aditivado com glicerol (AZHT16115E) na estufa.

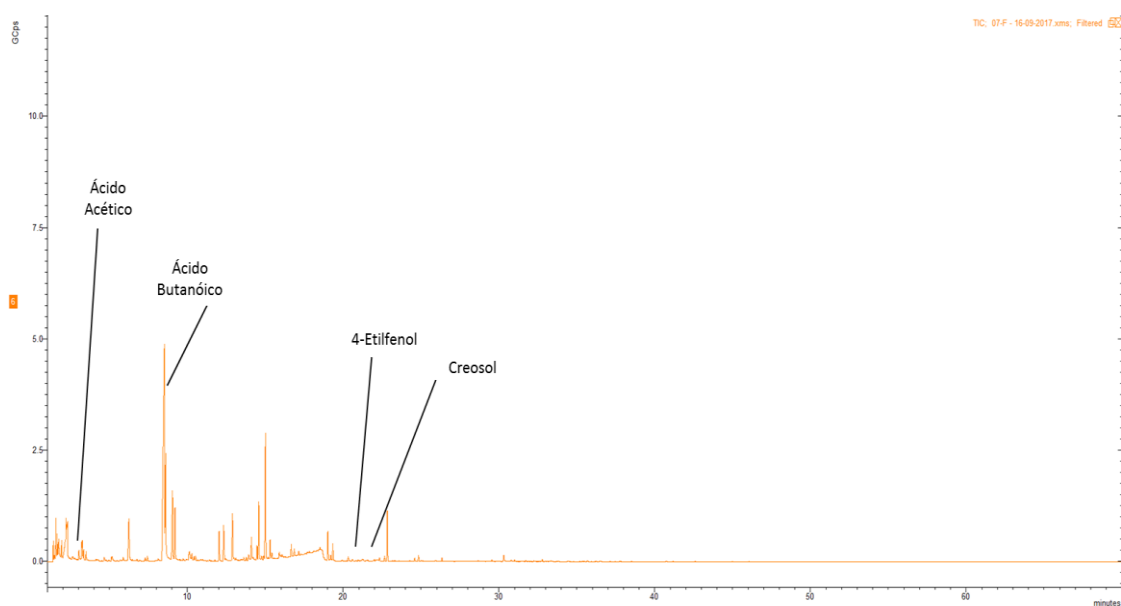
Meses	AZHT16114F		AZHT16115F	
	HT+Ty (mg/L)	HT+Ty (μmol)	HT+Ty (mg/L)	HT+Ty (μmol)
0,8		-	-	-
1,6	-	-	-	-
3,3	-	-	-	-
3,8	300	2043,7	243	1656,2
4,5	-	-	-	-
5,5	263	1789,9	222	1509,3
6,2	272	1856,6	166	1135,1
7,6	329	2244	240	1639,8
8,8	298	2013,4	215	1468,4
9,7	417,6	2817,4	294	1985,9
10,7	352,8	2380,4	219,6	1492,8
12,1	375,6	2526,6	274,8	1855,8
12,9	432	2930	290,4	2263,1

Tabela G3- Concentrações de HT+Ty para o azeite aditivado sob solução aquosa (AZHT16114F) e azeite aditivado com glicerol (AZHT16115F) no Frio.



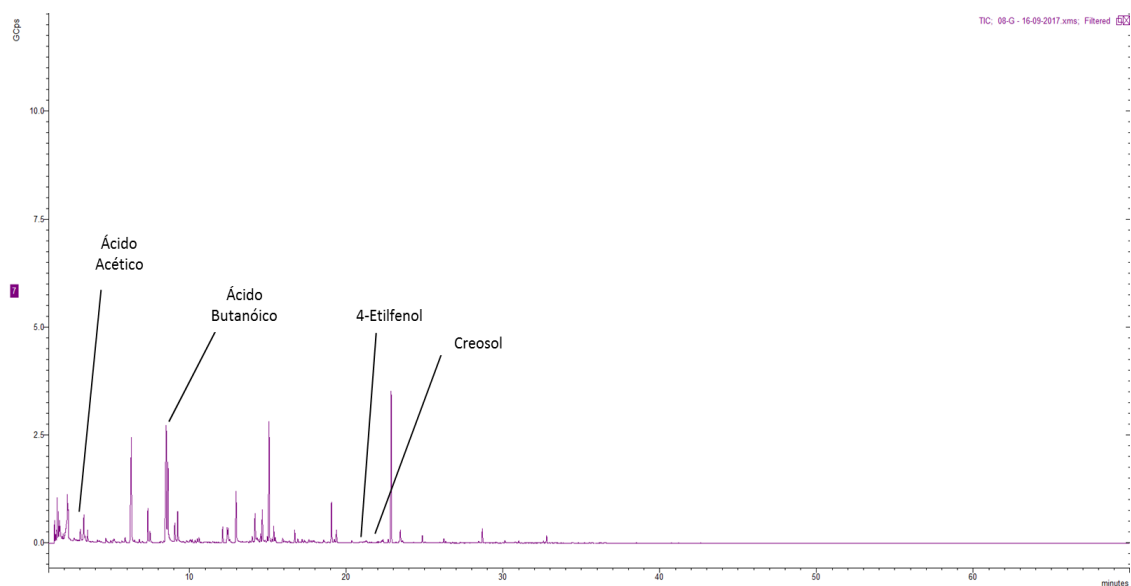
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,21E+10	1,15E+09	3,85E+08	5,94E+08

Figura G1- Cromatograma do azeite aditivado sem glicerol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (18/09/2017)



	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	6,58E+09	1,34E+09	4,03E+08	2,26E+08

Figura G2- Cromatograma do azeite aditivado com glicerol com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (18/09/2017)



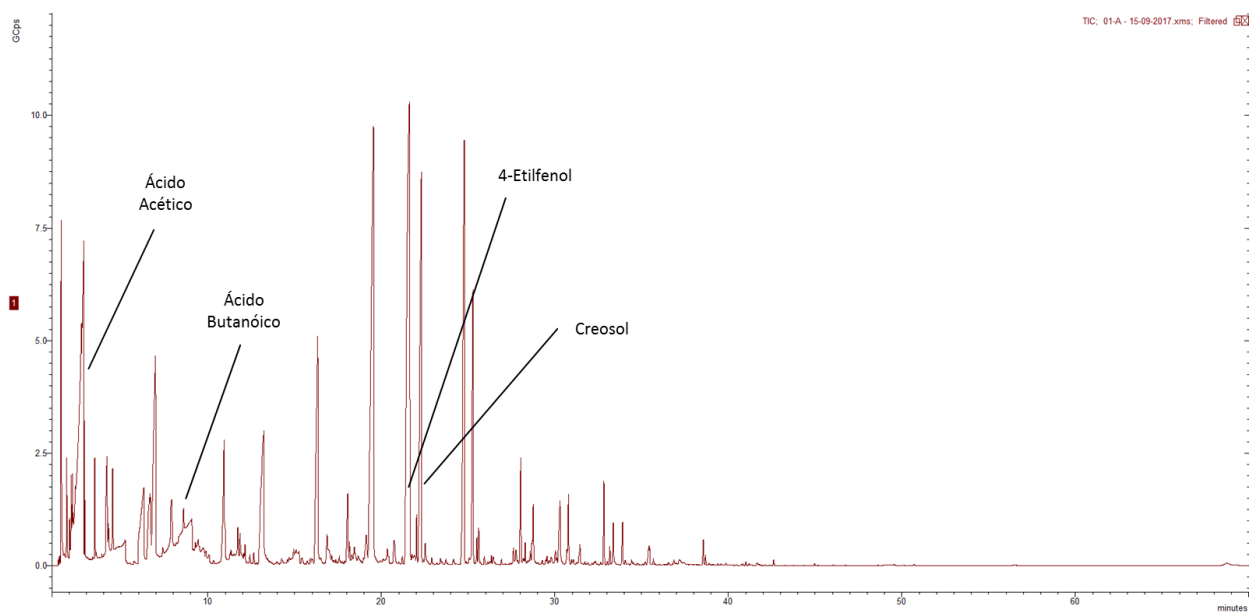
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	4,96E+09	4,21E+08	1,95E+08	2,08E+08

Figura G3- Cromatograma do azeite NaturOlive com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho.
(18/09/2017)

Anexo H

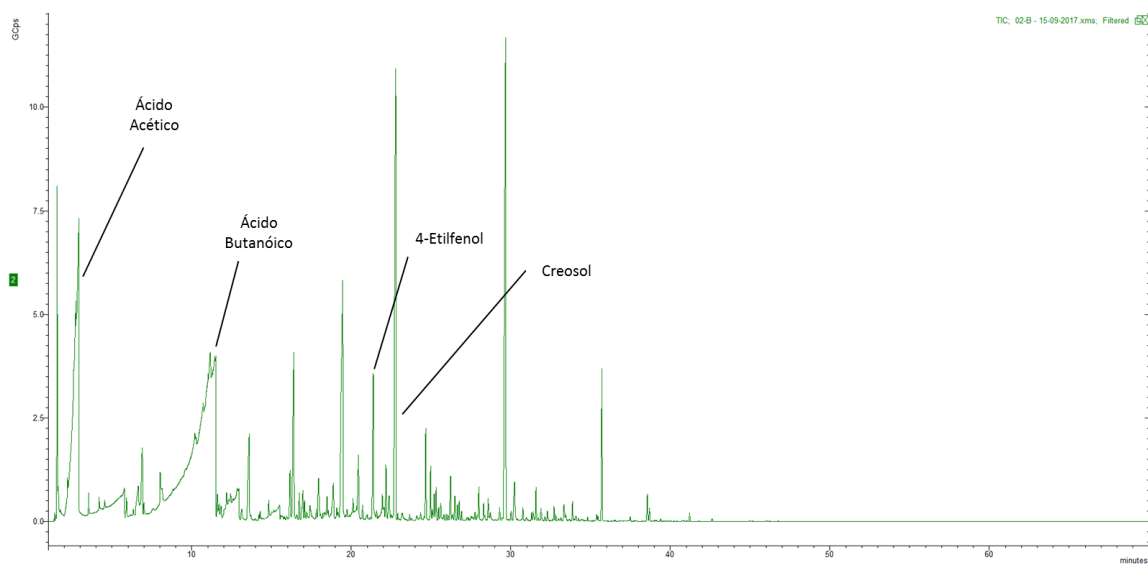
Dias	Concentração de HT no pó F1 (mg/L)	HT (%)
32	380	7,6
42	306	6,12
47	235	4,7
84	215	4,3
96	232	4,64

Tabela H1- Concentração de hidroxitirosol ao longo do tempo no pó F1 produzido a 23/02/2017.



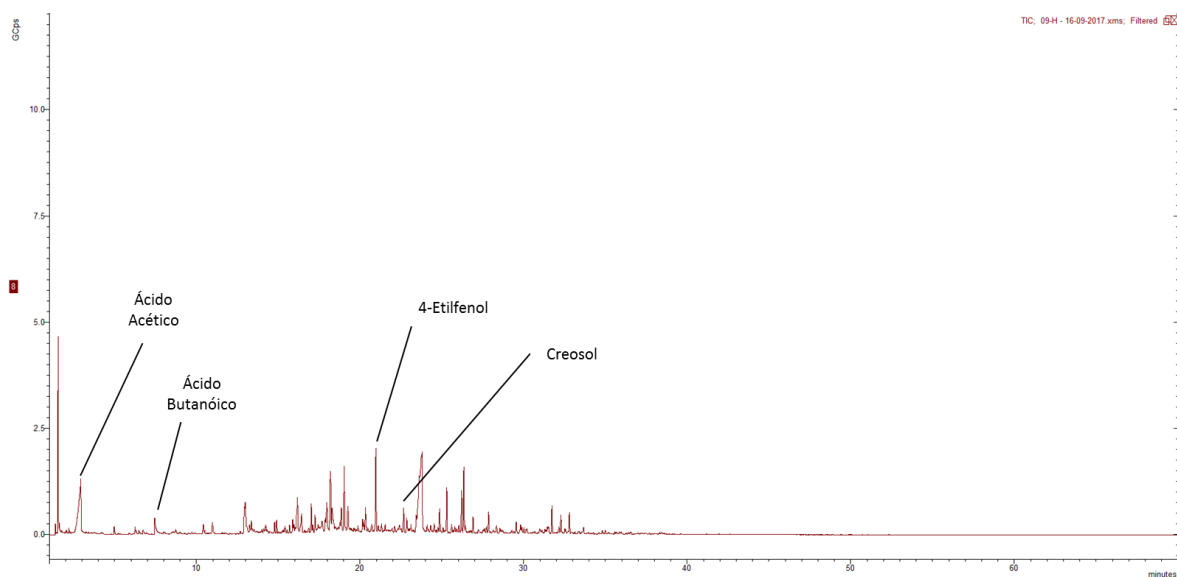
	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	9,39E+10	2,12E+10	5,48E+10	1,13E+11

Figura H1- Cromatograma do pó H com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (18/09/2017)



	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,22E+10	1,98E+11	2,72E+09	1,27E+10

Figura H2- Cromatograma do pó J com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho. (18/09/2017)



	Ácido Acético	Ácido Butanóico	Creosol	4-Etilfenol
Área dos picos de GC (UA)	1,17E+10	9,11E+08	2,56E+10	5,31E+09

Figura H3- Cromatograma do pó NaturOlive com a respectiva área dos picos relativos ao trabalho.
(18/09/2017)

Anexo I

Pó_Matriz	ρ (g/mL)
H_RO	0,29
L_RO	0,56
DSS_DSS	0,25
J_DSS	0,22
NaturOlive	0,69

Tabela I1- Densidade aparente medida para cada pó com a respectiva matriz. (12/07/2017)